



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

KEILA TAMIRES DA SILVA

**EFEITO DO ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia substellata* (AHTI) ENCAPSULADO
SOBRE A OSSIFICAÇÃO ENDOCONDAL DOS MEMBROS DA PROLE DE
RATAS WISTAR**

Recife
2019

KEILA TAMIRES DA SILVA

**EFEITO DO ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia substellata* (AHTI) ENCAPSULADO
SOBRE A OSSIFICAÇÃO ENDOCONDAL DOS MEMBROS DA PROLE DE
RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Área de concentração: Morfotecnologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Sônia Pereira Leite

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Katharine Raquel Pereira dos Santos

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Silva, Keila Tamires da

Efeito do ácido úsnico de *Cladonia substellata* (AHTI) encapsulado sobre a ossificação endocondral dos membros da prole de ratas Wistar / Keila Tamires da Silva- 2019.

69 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Sônia Pereira Leite

Coorientadora: Katharine Raquel Pereira dos Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em

Morfotecnologia. Recife, 2019.

Inclui referências

1. Líquen 2. Desenvolvimento ósseo 3. Encapsulação I. Leite, Sônia Pereira (orient.) II. Santos, Katharine Raquel Pereira (coorient.) III.

Título

579.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-328

KEILA TAMIRES DA SILVA

**EFEITO DO ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia substellata* (AHTI) ENCAPSULADO
SOBRE A OSSIFICAÇÃO ENDOCONDAL DOS MEMBROS DA PROLE DE
RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Área de concentração: Morfotecnologia

Aprovada em: 12/07/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Sônia Pereira Leite (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Juliana Pinto de Medeiros (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Luciana Maria Silva de Seixas Maia (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico a Deus, por sempre está presente em minha vida. Aos meus pais, e ao meu esposo, por todo apoio e incentivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu maravilhoso Deus, por sempre está presente em minha vida, por sempre me dá força para enfrentar meus maiores medos. Obrigada meu Deus pela tua grandeza, pelo teu amor incondicional.

Aos meus pais, Maria José da Silva e Paulo José da Silva, pelo o apoio e principalmente, a minha amada e querida mãe, por sua dedicação e por sempre me apoiar em tudo. Obrigada por ser esta mãe amiga e companheira de todas as horas.

Ao meu esposo, Michelson Gustavo de Barbosa Santana, por sempre me aconselhar e me acalmar nos meus momentos apreensivos. Obrigada pelos incentivos e companheirismo.

À minha orientadora, Sônia Pereira Leite, pela confiança, oportunidade e apoio durante a construção deste trabalho. Obrigada pela confiança.

À minha querida coorientadora, Katharine Raquel Pereira dos Santos, pela confiança, oportunidade e apoio durante a construção deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, paciência e incentivos. És um grande exemplo como pessoa e profissional.

Meu muitíssimo obrigada a minha amiga, Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho, pela paciência, ensinamentos e incentivos. Muito obrigada por sempre está à disposição para tirar minhas dúvidas e me acalmar nos meus momentos de aflição. És Um exemplo de mulher guerreira e batalhadora, que levarei sempre comigo.

Ao professor, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, pela orientação e ajuda na realização da morfometria e estatística do presente trabalho.

Agradeço às professoras, Noêmia Pereira da Silva Santos e Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho, pelo material fornecido para realização desta pesquisa.

Agradeço a todos que fazem parte da família Biotecnologia e Fármacos, em especial, aos colegas da área de histologia. Muito obrigada pelos momentos de apoio.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela oportunidade de realizar este trabalho.

A todos os meus professores do Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia (UFPE), que contribuíram para minha formação durante o mestrado.

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia (UFPE), pelas orientações.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta no desenvolvimento deste trabalho.

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine (Bíblia; Coríntios, 2008).

RESUMO

O ácido úsnico, resultante do metabolismo secundário líquênico apresenta relevantes atividades biológicas, tais como antitumoral, antiproliferativa e antiviral. Porém, a sua aplicação terapêutica é bastante limitada devido a relatos de efeitos colaterais, como toxicidade reprodutiva. Desta forma, é necessário o desenvolvimento de alternativas inovadoras, a exemplo da encapsulação em microesferas de copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA), que permite aumentar a eficiência terapêutica e diminuir os efeitos tóxicos dos compostos. Em vista disto, este trabalho objetivou investigar o efeito do ácido úsnico de *cladonia substellata* encapsulado em microesferas de PLGA sobre a ossificação endocondral dos membros da prole de de ratas Wistar. As microesferas contendo ácido úsnico foram preparadas utilizando a técnica de emulsão múltipla, seguida de evaporação do solvente, e caracterizadas através da eficiência de encapsulação. No estudo experimental foram utilizadas 12 ratas Wistar, que foram distribuídas aleatoriamente em grupo controle (n=6) e tratado (n=6), da prole de cada rata em estudo foram analisados 6 fetos, totalizando 72 fetos. As fêmeas do grupo controle receberam 1,0 ml de solução fisiológica, e as do grupo tratado no período do 6º ao 15º dia de gestação receberam dose de 25 mg/kg/dia de ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA por via oral. Ao 20º dia de gestação as fêmeas foram eutanasiadas e seus fetos retirados para análise histomorfométrica dos membros anteriores e posteriores. Os resultados das observações histológicas da ossificação endocondral dos membros anteriores e posteriores dos fetos tratado em relação ao controle foram similares, contudo a histomorfometria das zonas do disco epifisário dos membros anteriores e posteriores dos fetos apresentaram as zonas de proliferação e hipertrófica com diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Nas análises histomorfométricas da quantidade de fibras colágenas tipo I no tecido ósseo dos membros posteriores dos fetos tratados mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Com base nestes dados pode-se concluir que o ácido úsnico de *Cladonia substellata* encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral apresentou moderada toxicidade sobre os membros da prole de ratas Wistar. Desta forma, esse estudo sugere que a liberação controlada do ácido úsnico de *Cladonia substellata* encapsulado em microesferas de PLGA minimiza os efeitos da toxicidade do composto sobre o desenvolvimento ósseo da prole de ratas Wistar.

Palavras chave: Desenvolvimento ósseo. Embriofetotoxicidade. Encapsulação. Líquen. Metabólito Secundário

ABSTRACT

The usnic acid resulting from the secondary lichenic metabolism presents relevant biological activities, such as antitumor, antiproliferative and antiviral. However, its therapeutic application is very limited due to reports of side effects, such as reproductive toxicity. Thus, it is necessary to develop innovative alternatives, such as encapsulation in microspheres of lactic and glycolic acid copolymer (PLGA), which allows to increase the therapeutic efficiency and reduce the toxic effects of the compounds. In view of this, this study aimed to investigate the effect of *Cladonia substellata* usnic acid encapsulated in PLGA microspheres on the endochondral ossification of the offspring of Wistar rats. The microspheres containing the usnic acid were prepared using the multiple emulsion technique, followed by evaporation of the solvent, and characterized by the encapsulation efficiency. In the experimental study, we used 12 Wistar rats, which were randomly distributed in control group (n=6) and treated (n=6), of the offspring of each rat in the study, six fetuses were analyzed, totaling 72 fetuses. The females of the control group received 1.0 ml of saline solution, and those of the group treated in the period from 6th to 15th day of gestation received a dose of 25 mg/kg/day of usnic acid encapsulated in PLGA microspheres orally. On the 20th day of gestation, the females were euthanized and their fetuses were removed for histomorphometric analysis of the anterior and posterior limbs. The results of the histological observations of endochondral ossification of the anterior and posterior limbs of the fetuses treated in relation to the control were similar, however the histomorphometry of the epiphyseal disk zones of the anterior and posterior limbs of the fetuses showed the proliferation and hypertrophic zones with significant differences ($p < 0,05$) in relation to the control group. In the histomorphometric analyses of the amount of collagen fibers type I in the bone tissue of the posterior limbs of the treated fetuses showed significant differences ($p < 0,05$) in relation to the control group. Based on these data it can be concluded that the *Cladonia substellata* usnic acid encapsulated in PLGA microspheres at a dose of 25 mg/kg/day orally presented moderate toxicity on the offspring of Wistar rats. Thus, this study suggests that the controlled release of *Cladonia substellata* usnic acid encapsulated in PLGA microspheres minimizes the effects of compound toxicity on the bone development of the offspring of Wistar rats.

Keywords: Bone development. Embryotoxicity. Encapsulation. Lichen. Secondary metabolite

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Classificação dos líquens. (A) folioso (*Baeomyces placophyllus*), (B) crostoso (*Calopadia puiggarii*), (C) fruticoso (*Cladia retipora*), (D) filamentoso (*Usnea scabrida*), (E) dimórfico (*Cladonia gracilis*), (F) esquamuloso (*Xanthoria turbinata*)20
- Figura 2 - Estrutura do talo líquênico. (C) Córtex; (Al) Algas; (Md) Medula; (Ca) Cordón axial21
- Figura 3 - Utilização dos líquens na indústria de perfumaria francesa. Perfumes franceses22
- Figura 4 - Uso dos líquens na indústria de cosméticos. (A) Composição de loção após barba, (B) composição da hena, (C) composição de colônia22
- Figura 5 - Tingimento de lã com corantes obtidos de algumas espécies de líquens23
- Figura 6 - Líquens utilizados no processo de mumificação23
- Figura 7 - Exemplos de medicamentos obtidos dos líquens. (A) Remédio Granobil à base de *Usnea Barbata*, (B) Pastilhas Isla-Mint® à base de *Cetraria islandica*, (C) Xarope Tannenblut N® à base de *Cetraria islandica*24
- Figura 8 - Estrutura química do ácido úsnico destacando o carbono quiral 9b25
- Figura 9 - Comparação das variações de concentrações do princípio ativo administrado em formas farmacêuticas convencionais e de sistemas de liberação controlada. (a) Administração convencional, (b) Administração por meio de sistemas liberação controlada, (A1, A2, A3, A4) Aplicação do fármaco28
- Figura 10 - Estrutura dos diferentes tipos de micropartículas31
- Figura 11 - Representação esquemática da organização molecular da matriz extracelular da cartilagem hialina34
- Figura 12 - Representação esquemática da formação do osso longo a partir de um modelo cartilaginoso36
- Figura 13 - Fotomicrografia do disco epifisário, demonstrando as cinco zonas37
- Figura 14 - Representação esquemática da tripla hélice. Cadeias peptídicas do tipo α 1 (amarelo), cadeia peptídica do tipo α 2 (vermelho). Barra demonstra distância (8,6nm) de uma volta completa da hélice39
- Figura 15 - Representação esquemática das etapas da biossíntese do colágeno40

- Figura 16 - Fotomicrografia do fêmur da prole de ratas Wistar do grupo controle (A) e grupo tratado com ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (B). Visualização das epífises em molde de cartilagem hialina (setas), diáfise com tecido ósseo (cabeça de seta). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra de Escala: 100 μ m46
- Figura 17 - Fotomicrografia do disco epifisário do fêmur da prole de ratas Wistar do grupo controle (A) e grupo tratado com o ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (B). Visualização da zona de repouso (asterisco), zona de proliferação dos condrócitos (setas menores), zona de condrócitos hipertróficos (barras), zona calcificada (setas maiores), zona de ossificação (cabeças de setas). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra de Escala: 100 μ m48
- Figura 18 - Fotomicrografia dos condrócitos em proliferação (setas) no disco epifisário do fêmur da prole de ratas Wistar do grupo controle (A) e grupo tratado com ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (B). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra de Escala: 100 μ m49
- Figura 19 - Fotomicrografia dos condrócitos hipertróficos (setas) do disco epifisário do fêmur da prole de ratas Wistar do grupo controle (A) e grupo tratado com ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (B). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra de Escala: 100 μ m50
- Figura 20 - Fotomicrografia das fibras de colágeno tipo I (setas) presente no tecido ósseo do úmero da prole de ratas Wistar do grupo controle (A) e grupo tratado com ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (B). Coloração Picosirius Red. Barra de Escala: 100 μ m52
- Figura 21 - Fotomicrografia das fibras de colágeno tipo I (setas) presente no tecido ósseo do fêmur da prole de ratas Wistar do grupo controle (A) e grupo tratado com ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (B). Coloração Picosirius Red. Barra de Escala: 100 μ m52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Avaliação histomorfométrica da área das zonas de proliferação e hipertrófica do disco epifisário dos membros anteriores e posteriores dos neonatos expostos ao ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (tratado) e do grupo controle. Dados expressos com média \pm desvio padrão (DP)48
- Tabela 2 - Avaliação da área (μm^2) celular dos condrócitos presentes nas zonas de proliferação e hipertrófica do disco epifisário dos membros dos neonatos expostos ao ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (tratado) e do grupo controle. Dados expressos com média \pm desvio padrão (DP)50
- Tabela 3 - Análise do número de condrócitos nas zonas de proliferação e hipertrófica do disco epifisário dos membros de neonatos expostos ao ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (tratado) e do grupo controle. Dados expressos com média \pm desvio padrão (DP)51
- Tabela 4 - Avaliação histomorfométrica das fibras colágenas tipo I presente no tecido ósseo dos membros de neonatos expostos ao ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (tratado) e do grupo controle. Dados expressos com média \pm desvio padrão (DP)53

LISTA DE ABREVIACOES

μg	Micrograma
μm	Micrmetro
A/O	gua/leo
A/O/A ou W/O/W	gua/óleo/gua
DL50	Dose letal que mata 50% dos indivíduos expostos
D0	Dia zero
DP	Desvio padrão
g	Gramas
HE	Hematoxilina e eosina
kg	Quilograma
m/v	Massa/volume
mg	Miligras
mm^2	Mmetro quadrado
mL	Mililitro
NBF	Formalina neutra tamponada
nm	Nanmetro
PLGA	Copolímero de ácido láctico e glicólico
PVA	lcool polivinílico
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	LIQUENS.....	19
2.2	ÁCIDO ÚSNICO	24
2.3	SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	27
2.3.1	Microesferas	30
2.4	CARTILAGEM HIALINA.....	32
2.5	OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRA.....	35
2.6	COLÁGENO TIPO I.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	MATERIAL LIQUÊNICO	42
3.2	PREPARAÇÃO DE MICROESFERAS DE PLGA CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO	42
3.3	ENSAIOS DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS MICROESFERAS DE PLGA	42
3.4	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	43
3.5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	43
3.6	ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS	44
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
4	RESULTADOS	46
4.1	OBSERVAÇÃO HISTOLÓGICA DA OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRA DOS MEMBROS ANTERIORES E POSTERIORES DOS NEONATOS.	46
4.2	AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DAS ZONAS DO DISCO EPIFISÁRIO DOS MEMBROS ANTERIORES E POSTERIORES DOS NEONATOS.	46
4.3	AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DOS CONDROCITOS NAS ZONAS DE PROLIFERAÇÃO E HIPERTRÓFICA DO DISCO EPIFISÁRIO DOS MEMBROS ANTERIORES E POSTERIORES DOS NEONATOS.	49
4.4	AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DAS FIBRAS DE COLÁGENO TIPO I PRESENTE NO TECIDO ÓSSEO DOS MEMBROS ANTERIORES E POSTERIORES DOS NEONATOS.....	51
5	DISCUSSÃO	54

6	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Os líquens são resultantes da associação simbiótica entre fungos (micobionte) e uma alga ou cianobactéria (fotobionte). São uma das mais importantes fontes naturais de compostos biologicamente ativos. Entre estes compostos destaca-se o ácido úsnico, que é extensivamente estudado, devido as suas diversas atividades biológicas (BENATTI; MARCELLI, 2007; OTÁROLA et al., 2010; NUNES et al., 2011).

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8-9b-dimetil-1,3(2H,9 α / β H)-dibenzofurandiona; C₁₈H₁₆O₇], é um composto de origem natural resultante do metabolismo secundário de líquens, descrito na literatura com várias propriedades farmacológicas, tais como antitumoral (SANTOS et al., 2006; BURLANDO et al., 2009), antiviral (SOKOLOV et al., 2012; SHTRO et al., 2014), anti-inflamatório (VIJAYAKUMAR et al., 2000; SU et al., 2014), antioxidante (BEHERA et al., 2012; SUWALSKY et al., 2015), antifúngico (NITHYANAND et al., 2015), inseticida e larvicida (SAHIB et al., 2008; BOMFIM et al., 2009).

Apesar das diversas atividades biológicas do ácido úsnico já relatadas na literatura, existem algumas limitações para sua aplicação terapêutica, como a alta hepatotoxicidade, teratogenicidade, baixa hidrossolubilidade, toxicidade reprodutiva, e consequentemente, uma diminuição na eficácia terapêutica (FRAVEAU et al., 2002; RIBEIRO-COSTA et al., 2004; PRAMYOTHIN et al., 2004; SANCHEZ et al., 2006; SANTOS et al., 2006; SILVA, 2017; SILVA et al., 2017; MARINHO et al., 2017).

Recentes estudos sobre a toxicidade reprodutiva do ácido úsnico durante o período gestacional relatam relevantes sinais de toxicidade na prole de ratas prenhes tratadas com o composto na dose de 25 mg/kg/dia, apresentaram malformações morfológicas e histológicas, como atrofia, retardo no processo de ossificação endocondral e diminuição da quantidade de colágeno nos membros dos neonatos. Estes estudos demonstram a capacidade do ácido úsnico de promover malformações no desenvolvimento ósseo. (SILVA et al., 2017; SILVA, 2017).

Alguns compostos quando administrados em fases sensíveis do desenvolvimento, como o período gestacional e a idade infantil, podem interagir de forma negativa com o organismo (DUEWELHENKE; KRUT; EYSEL, 2006), isto porque a maioria dos agentes químicos atravessam facilmente a placenta durante o período gestacional, podendo resultar em efeitos importantes sobre o desenvolvimento de organismo passivo (embrião e/ou feto) (WEBSTER; FREEMAN, 2001; LEMONICA et al., 2008).

Experimentos realizados com a isotretinoína (ácido 13-cis-retinóico), um derivado da vitamina A, que apresenta algumas propriedades farmacológicas semelhantes ao ácido úsnico,

demonstraram efeitos indesejáveis na administração deste composto durante o processo de ossificação endocondral em ratos jovens (PARCCELLI et al., 2015; CAJUEIRO et al., 2014).

A ossificação endocondral é a principal responsável pela formação dos ossos curtos e longos, a qual se inicia com um molde de cartilagem hialina. Este tipo de ossificação depende da proliferação e diferenciação da cartilagem hialina para sua formação. É bastante susceptível a interferências, visto que é um processo complexo e controlado. E a matriz extracelular do tecido ósseo é constituída principalmente por fibras colágenas do tipo I que apresenta função estrutural dando resistência e suporte ao tecido (VELOSA et al., 2003; ATAYDE, 2011; PARCCELLI et al., 2015; DOLCI, 2016).

A utilização terapêutica de alguns compostos no sistema esquelético, como o ácido úsnico em forma farmacêutica convencional torna-se muitas vezes inviável, sendo necessário alternativas que modifique as suas características físico-químicas, minimize os seus efeitos tóxicos e melhore a sua biodisponibilidade (RIBEIRO-COSTA et al., 2004; DUEWELHENKE et al., 2006; DA SILVA SANTOS et al., 2006).

Tais limitações impulsionaram o desenvolvimento de alternativas inovadoras, a exemplo da encapsulação do ácido úsnico em sistemas de liberação controlada, como as microesferas de copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA), que permitem diminuir os efeitos tóxicos do composto no organismo, mantendo de forma eficaz o seu princípio ativo, e potencializando a sua aplicação terapêutica (RIBEIRO-COSTA et al., 2004; SANTOS et al., 2006; SIQUEIRA-MOURA et al., 2009; GRUMEZESCU et al., 2014; MARTINELLI et al., 2014).

Tendo em vista, os relatos dos efeitos tóxicos do ácido úsnico durante o período gestacional, e a relevância de pesquisas que desenvolva recursos biotecnológicos que viabilizem a utilização na terapêutica, objetivou-se avaliar o efeito do ácido úsnico de *Cladonia substellata* encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral sobre a ossificação endocondral dos membros da prole de ratas Wistar.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Investigar o efeito do ácido úsnico de *Cladonia substellata* encapsulado em microesferas de PLGA sobre a ossificação endocondral dos membros da prole de ratas Wistar.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Observar a histologia da ossificação endocondral dos membros anteriores e posteriores dos neonatos;
- Avaliar a histomorfometria das zonas de proliferação e hipertrófica do disco epifisário dos membros anteriores e posteriores dos neonatos;
- Analisar a histomorfometria das fibras colágenas tipo I no tecido ósseo dos membros anteriores e posteriores dos neonatos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LIQUENS

Os líquens são seres vivos resultantes de associações simbióticas entre algas e/ou cianobactérias (fotobiontes) e fungos (micobiontes), os quais consistem 90% do volume dos líquens. Os fungos que constituem os líquens são na sua maioria (98%) do Filo Ascomycota, pertencentes ao Reino Fungi. Enquanto, as algas e as cianobactérias são do filo Chlorophyta e Cyanophyta pertencentes aos Reinos Protista e Monera, respectivamente (CARRAZONI, 2003; BENATTI; MARCELLI, 2007; OTÁROLA et al., 2010).

Estes organismos apresentam ampla distribuição geográfica, habitam desde os trópicos aos polos. Estima-se que existam cerca de 18.500 espécies conhecidas de líquens, com dezenas de novas espécies sendo descobertas a cada ano. São considerados cosmopolitas, podem ser encontrados tanto em ambientes luminosos como sombreados, e suportam condições extremas de temperatura e umidade (COCHIETTO et al., 2002; VERA et al., 2002, 2004; NASH, 2008; OKSANEN, 2006; MOLNÁR; FARKAS, 2010).

O talo líquênico é classificado de acordo com seu aspecto morfológico, como foliosos (Figura 1 A), crostosos (Figura 1 B), fruticosos (Figura 1 C), filamentosos (Figura 1 D), dimórficos (Figura 1 E), esquamulosos (Figura 1 F). Fixam-se em diferentes tipos de substratos, como rochas, solos, folhas, galhos e troncos de árvores e nos mais variados substratos desde que encontre as condições necessárias para o seu desenvolvimento (BUDEL; SCHEIDEGGER, 2008; MARTINS, 2013).

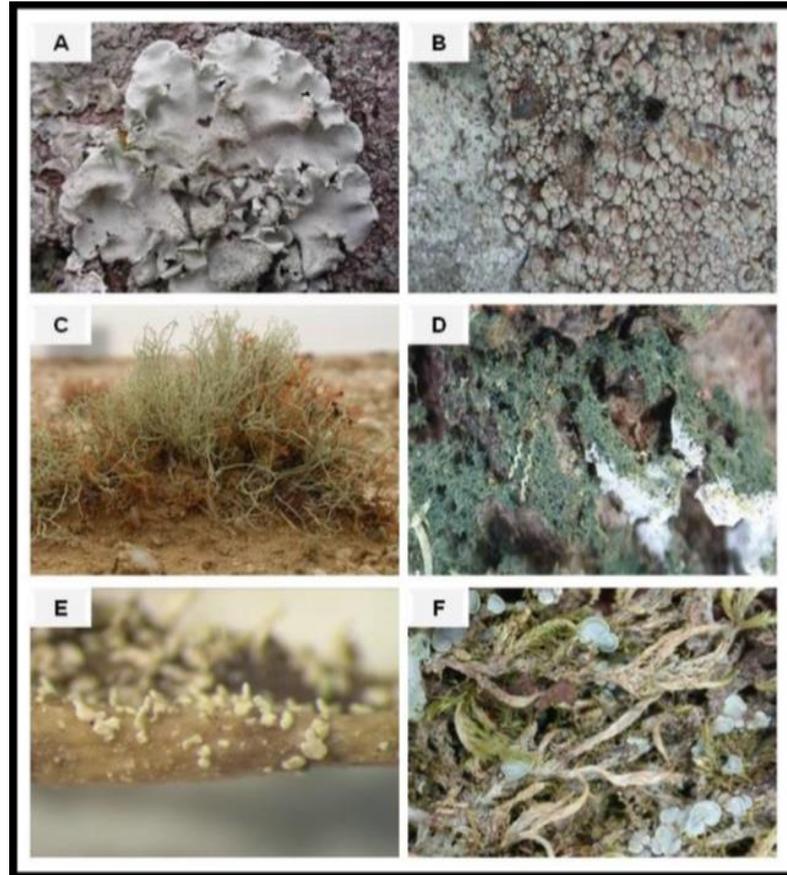


Figura 1: Classificação dos líquens. (A) folioso (*Baeomyces placophyllus*), (B) crostoso (*Calopadia puiggarii*), (C) fruticoso (*Cladia retipora*), (D) filamentoso (*Usnea scabrida*), (E) dimórfico (*Cladonia gracilis*), (F) esquamuloso (*Xanthoria turbinata*). Fonte: www.tropicallichens.net. Acesso em: 15.08.2018.

Os líquens produzem várias substâncias que são divididas em metabólitos primários e metabólitos secundários. Estes metabólitos são classificados de acordo com a sua localização no talo. Os metabólitos localizados nas partes intracelulares são chamados de metabólitos primários e estão ligados na parede celular, dentre eles estão os carotenóides, os aminoácidos, as proteínas, os glicolipídeos, os carboidratos e os pigmentos (clorofila, xantofila, carotenos) (BOUSTIE; TOMASI; GRUBE, 2010). Enquanto os metabólitos localizados nas partes extracelulares são denominados de metabólitos secundários, encontrados na medula ou no córtex (Figura 2), raramente nas duas camadas. Estes têm como exemplos os ácidos úsnico, protocetrárico, fumarprotocetrárico, salazínico, lecanórico e entre outros. Estas substâncias líquênicas são insolúveis em água, com peso molecular relativamente baixo (MULLER, 2001; CARRAZONI, 2003; MOLNÁR; FARKAS, 2010; MARTINS, 2013).

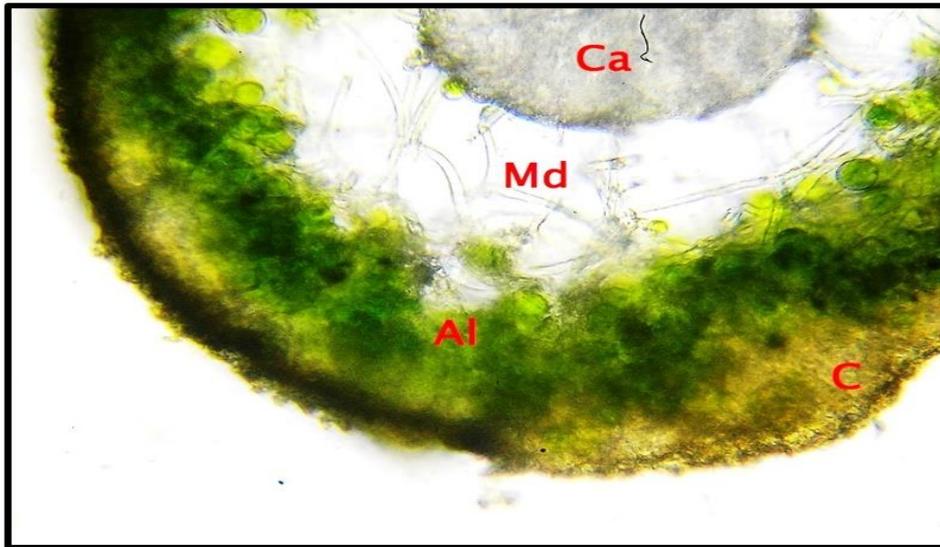


Figura 2: Estrutura do talo liquênico. (C) Córtex; (Al) Algas; (Md) Medula; (Ca) Cordón axial. Fonte: <http://trepariscosfieldnotebook.blogspot.com.br/2014/02/anatomia-yestructura-del-talo-liquenico.html>. Acesso em 14.08.2018.

Os metabólitos secundários dos líquens apresentam uma infinidade de atividades biológicas quando isolados. Estudos revelam que os metabólitos secundários liquênicos exibem as mais variadas atividades biológicas, tais como antiviral, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral. Desta forma, as substâncias liquênicas vêm despertando grandes interesses nos pesquisadores em diversas áreas, como na microbiologia, indústrias de cosméticos e principalmente na área da farmacologia em substâncias, como fenólicas, depsídeos, depsidonas, depsonas, lactonas, quinonas, derivados do ácido pulvínico, dibenzofurano e ácido úsnico (PIOVANO et. al., 2002; MOLNÁR; FARKAS, 2010; NUNES et al., 2011; MARTINS, 2013).

Pesquisas relatam que os líquens são utilizados na alimentação humana em diferentes culturas como na América, Europa, Ásia e África. Por serem baratos de fácil aquisição e por ter propriedades nutritivas são bastantes utilizados sob forma de farinha para pão e bolo. Porém, os líquens apresentam um caráter ácido apresentando um sabor amargo e além disso têm a capacidade de acumular toxinas do meio ambiente (IVANOVA; IVANOV, 2009; MARTINS, 2013).

Substâncias liquênicas são utilizadas nas indústrias de perfumes (Figura 3) comercializados em países do Sudeste da Europa Central e exportado para França. Os compostos aromáticos dos líquens são extraídos com benzeno ou éter de petróleo. Desta forma, torna-se um componente chave para serem utilizados como fixadores de perfumes de muitas

fragrâncias. São também amplamente utilizados em diversos produtos nas indústrias de cosméticos (Figura 4 A, B e C) (MARTINS, 2013; MARINHO, 2017).



Figura 3: Utilização dos líquens na indústria de perfumaria francesa. Perfumes franceses. Fonte: <http://www.sniffapaloozamazazine.com/ROSE.html>. Acesso em 15.08.2018.



Figura 4: Uso dos líquens na indústria de cosméticos. (A) Composição de loção após barba, (B) composição da hena, (C) composição de colônia. Fonte: www.lichens.com. Acesso em 17.08.2018.

Desde a antiguidade, os metabólicos secundários obtidos de diferentes espécies de líquens são utilizados como corantes (Figura 5). Outro uso interessante com os líquens era a sua utilização no processo de embalsamamento de múmias (Figura 6) no Egito Antigo, aproximadamente 5.000 anos atrás, por apresentar propriedades aromáticas, conservantes, altamente absorventes e leves eram de grande utilidade neste processo (LLANO, 1951; HUNECK, 1999; BATTS, CALDER 2004).



Figura 5. Tingimento de lã com corantes obtidos de algumas espécies de líquens. Fonte: www.allfiberarts.com/library/aa05/aa090105.html. <http://ecologicalartist.wordpress.com>. <http://ocid.nacse.org/lichenland/html/meeting.html>. Acesso em 18.09.2018.



Figura 6: Líquens utilizados no processo de mumificação. Fonte: <http://www.solarnavigator.net/egyptiancatmummies.htm>. Acesso em 18.09.2018.

Na medicina popular, os líquens sempre foram utilizados no tratamento de diversas doenças em várias partes do mundo através do uso de chás e preparações contra diversas enfermidades. Na Índia, os líquens do gênero *Parmelia* são utilizados para o tratamento de diversas enfermidades, como dores de cabeça, doenças de pele, infecção urinária, vômito, diarreia e lepra (TIWARI et al., 2011). Além da ampla utilização do uso dos líquens na medicina popular, a indústria farmacêutica, principalmente da Europa, comercializa alguns medicamentos que têm como princípio ativo substâncias extraídas de líquens. Extratos da *Usnea barbata* são comercializados na Alemanha com o nome comercial de Granobil® (Figura

7 A) para dores de garganta (FRANKOS, 2005). Outra aplicação na indústria farmacêutica europeia é a comercialização de pastilhas, denominadas Isla-Mint® e Isla-Moos® (Figura 7 B), preparadas a partir de extratos obtidos da *Cetraria islandica* usadas para tratar doenças do trato respiratório superior. Além dessas pastilhas, outros medicamentos são feitos a partir da *Cetraria islandica*, como por exemplo, os xaropes expectorantes de nomes comerciais Pulmobronquiol Plus® e Tannenblut N® (Figura 7 C) (HECKER; VOLP, 2004).



Figura 7: Exemplos de medicamentos obtidos dos líquens. (A) Remédio Granobil à base de *Usnea Barbata*, (B) Pastilhas Isla-Mint® à base de *Cetraria islandica*, (C) Xarope Tannenblut N® à base de *Cetraria islandica*. Fonte: www.eczane gulden.Com / main/ iceland_moss. Acesso em 18.09.2018.

Além disso, os líquens cumprem um importante papel ecológico de fixadores de nitrogênio em ecossistemas áridas e constituem grande parte da biomassa de organismos autotróficos em ambientes de baixa disponibilidade de nutrientes. São usados como bioindicadores de poluição, pois, são capazes de absorver e acumular metais pesados e outros elementos químicos (WILL-WOLF et al., 2004; NASH, 2008; SOARES et al., 2014).

2.2 ÁCIDO ÚSNICO

O ácido úsnico, [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8-9b-dimetil-1,3(2H,9 α / β H) dibenzofurandiona; C₁₈H₁₆O₇] (Figura 8), é um metabólito secundário liquênico que foi isolado pela primeira vez por Pfaff, em 1826 do gênero *Cetraria*. Pode ser isolado de vários gêneros, tais como, *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae) e *Parmelia* (Parmeliaceae). Este composto caracteriza-se por ser uma

substância de pigmentação amarelada e de baixa solubilidade em água (10 mg/100 mL a 25 °C). Ocorre na natureza em duas formas enantioméricas (-) e (+), que indica uma projeção angular do grupamento metil localizado na posição 9b (MULLER, 2001; INGÓLFSDÓTTIR, 2002; COCCHIETTO et al., 2002; SOKOLOV et al., 2012).

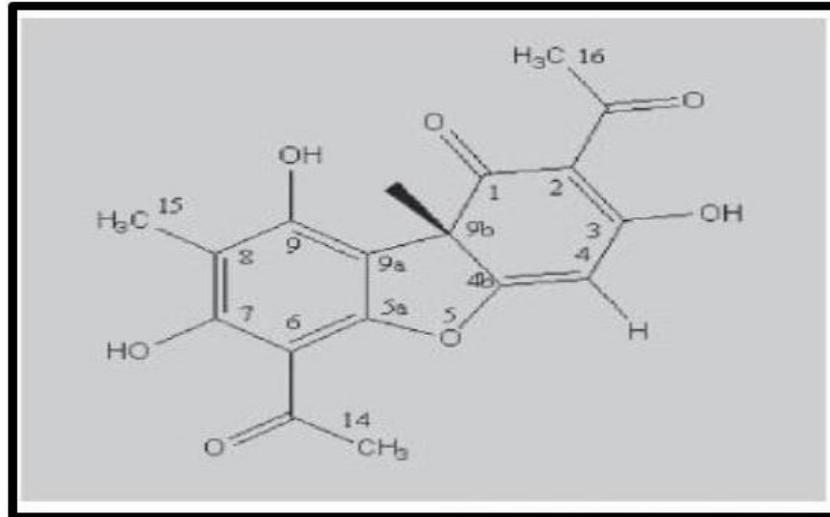


Figura 8: Estrutura química do ácido úsnico destacando o carbono quiral 9b. Fonte: SIQUEIRA-MOURA et al. (2008).

Entre os metabólitos secundários dos líquens, o ácido úsnico é um dos mais conhecidos e estudados. É bastante utilizado na medicina popular no tratamento de micoses, dor de garganta, dor de dente, febre e também utilizado como, antisséptico e cicatrizante (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Além disso, apresenta diversas atividades biológicas, tais como antibiótica (NUNES et al., 2011; COCCHIETTO et al., 2002; ELO, MATIKAINEN, PELTTARI, 2007; SEGATORE et. al., 2012), anti-inflamatória (VIJAYAKUMAR et. al., 2000), antineoplásica (SANTOS et. al., 2006; RIBEIRO-COSTA et al., 2004; BRISDELLI et. al., 2013), antiviral (SOKOLOV, et. al., 2012), antioxidante (KOHLHARDT-FLOEHR et. al., 2010, BEHERA; MAHADIK; MOREY, 2012) cicatrizante (BRUNO et. al., 2013) e pesticida (MARTINS, 2013).

Na década de 40 foram realizadas as primeiras avaliações sobre a ação antibacteriana do ácido úsnico. Os resultados observados demonstraram que o ácido úsnico exercem preferencialmente sua atividade contra bactérias Gram-positivas. Ao decorrer da década de 40 foram realizados ensaios com bactérias, inclusive as patogênicas ao homem, que demonstraram que o ácido úsnico inibiu o crescimento de várias espécies de *Pneumococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Mycobacterium* (BUSTINZA, 1951; COCCHIETTO et al., 2002).

Em anos seguintes, foram realizados testes *in vivo* na atividade de um novo composto solúvel em água, fabricado com o ácido úsnico, sob o nome comercial de USNO (usnato de amônia), foi testado contra o fungo *Trichophyton gallinae*. Os resultados demonstraram que após 9-12 dias houve o desaparecimento total das colônias de fungos (VIRTANEN; KILPIO, 1957). O composto também foi testado contra leveduras presentes em secreções endobrônquicas de pacientes portadores de tuberculose pulmonar, sendo ativo contra espécies de *Candida* e *Saccaromyces* (BENZINGER; TOMÁSIC, 1960; CAPRIOTTI, 1961).

Estudo demonstrou a atividade imunológica do ácido úsnico através do uso de *patch*. Neste estudo foi observado que a atividade biológica do ácido úsnico pode ser dependente da presença do grupo COCH₃ na posição 7 e do grupo CH₃ na posição 9 na molécula (MITCHELL; SHIBATA, 1969).

Campos e Lopez (1972), relataram que o ácido úsnico inibiu a taxa de respiração e a atividade da amilase, protease, fosfatase. Em 1973, estudos com a germinação de sementes, demonstraram que o uso do ácido úsnico pode inativar algumas enzimas, como por exemplo, glutamato desidrogenase e a urease (VICENTE, GUERRA; VALLE, 1973; VICENTE et al., 1978).

Morris Kupchan e Kopperman (1975) foram os primeiros a investigar a atividade antitumoral com o carcinoma pulmonar de Lewis em ratos. Através desta investigação outros estudos demonstram que a capacidade do ácido úsnico de inibir células tumorais depende tanto da dose quanto do tempo em que os tumores ficam em contato com a substância. Após 46 h de exposição o percentual chegou a 90% de inibição do crescimento tumoral (CARDARELLI et al., 1997).

Scirpa et al. (1999), analisaram o efeito de uma formulação vaginal contendo ácido úsnico e o sulfato de zinco em pacientes do sexo feminino infectadas com o vírus do papiloma humano (HPV). Observaram resultados favoráveis, tanto na reepitelização das lesões, quanto na recorrência de infecção ao longo de um período de seis meses.

Vijayakumar et al. (2002), estudaram a ação anti-inflamatória do ácido úsnico em ratos Wistar com edema de pata, os resultados revelaram uma significativa atividade em doses dependentes do ácido úsnico comparado com o ibuprofeno. Neste mesmo ano, pesquisas mostraram que o ácido úsnico é um potente inibidor da proliferação do papiloma vírus em ratos, inibindo a síntese de DNA viral e reprimindo a ação da RNA transcriptase (CAMPANELLA et al., 2002).

Odabasoglu et al. (2006), foram os primeiros a observar o efeito antioxidante do ácido úsnico no tratamento de úlceras gástricas em modelo animal. Obtendo uma inibição significativa da formação de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica.

A atividade inseticida do ácido úsnico foi testada por Bomfim et al. (2009), contra o mosquito da dengue, o *Aedes aegypti*. Foi demonstrado eficácia do ácido úsnico contra o mosquito transmissor. Porém, na concentração avaliada, o mesmo mostrou-se ser tóxico para outros animais invertebrados nos ecossistemas.

O ácido úsnico também foi testado contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, e os resultados foram bastantes significativos com uma concentração inibitória mínima (MIC) de 62.5 µg mL-182 µM mL, quando comparado com o padrão (HONDA et al, 2010).

A atividade larvicida do ácido úsnico foi testada por Cetin et al. (2012) contra larvas do mosquito *Culiseta longiareolata*. Apresentou uma alta atividade larvicida com os valores de CL50 e CL90 iguais a 0,48 ppm e 1,54 ppm, respectivamente.

Bruno et al. (2013), avaliaram as propriedades cicatrizantes do ácido úsnico. Os experimentos foram realizados em ensaios in vitro e in vivo o qual exibiu um alto desempenho no tratamento de feridas, que estimulou o fechamento das monocamadas de queratinócitos na região lesionada.

Martins (2013), investigou a atividade moluscicida do usnato de potássio, o qual é sintetizado a partir do ácido úsnico foi investigado por Martins (2013), em *Biomphalaria glabrata* e seus embriões. Os resultados apresentaram 100% dos embriões dos caracóis mortos.

Nithyanand et al. (2015), avaliou a sensibilidade de biofilmes formados por *Candida albicans* frente ao ácido úsnico, a qual é a causa mais frequente de infecções associadas a cateteres, e apresenta grande resistência a antifúngicos. Os resultados apresentaram uma redução significativa (65%) na viabilidade das células metabolicamente ativas formadoras dos biofilmes.

O ácido úsnico é uma das substâncias liquênicas mais estudada, sendo considerado por alguns autores como a de maior potencial para as diversas atividades biológicas. Mas, apesar de o ácido úsnico apresentar várias propriedades biológicas o seu mecanismo de ação não está completamente elucidado.

2.3 SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

As substâncias liquênicas apresentam comprovada eficiência terapêutica. Porém, existem algumas limitações para sua aplicação terapêutica, como a toxicidade reprodutiva. E isto, é um dos problemas a serem resolvidos a partir do uso de novas formas de administração que possam melhorar a sua biodisponibilidade e diminuir os seus efeitos tóxicos (RIBEIRO-COSTA et al., 2004; HENRIQUE, FALCARE, LOPES, 2006).

Desde as últimas décadas, uma atenção considerável esteve voltada para o desenvolvimento de novos sistemas de transporte de drogas com a finalidade de diminuir os efeitos indesejáveis. Nestes sistemas, o fármaco está ligado a um transportador (carreador), que é o responsável por contornar as propriedades físico-químicas limitantes dos fármacos encapsulados, melhorando, desta forma, a potencialização do efeito terapêutico, o controle da absorção, a distribuição tecidual e a redução da toxicidade local e sistêmica (HENRIQUE, FALCARE, LOPES, 2006; BARROCAS et al., 2007; PEZINNI, 2007).

Os sistemas de liberação controlada possuem dois objetivos principais: manter constante a concentração da droga na faixa terapêutica assegurando uma maior biodisponibilidade, e reduzir os efeitos colaterais. E quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos, os sistemas de liberação controlada oferecem a grande vantagem de manter a concentração do fármaco constante na faixa terapêutica por um período prolongado aumentando a eficácia terapêutica e diminuindo significativamente a toxicidade (Figura 9) (HENRIQUE, FALCARE, LOPES, 2006; LYRA et al., 2007; PETITTI et al., 2008).

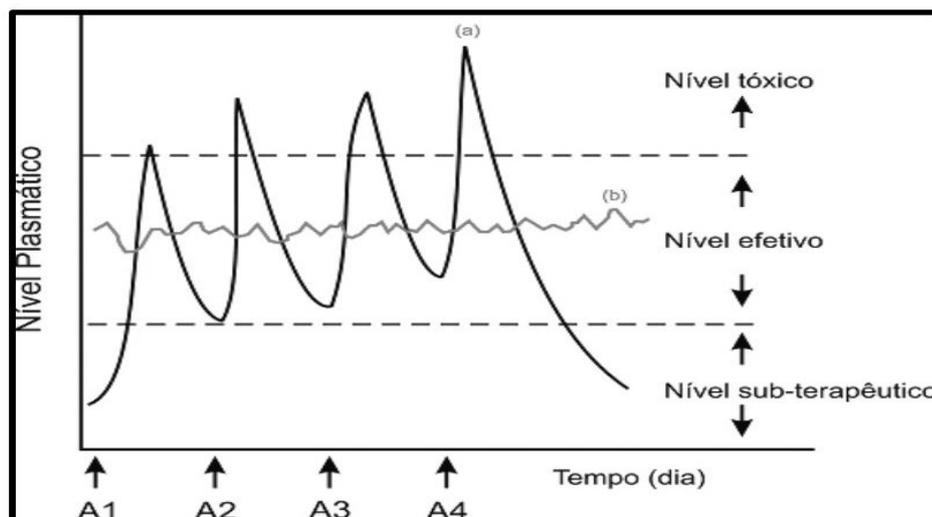


Figura 9: Comparação das variações de concentrações do princípio ativo administrado em formas farmacêuticas convencionais e de sistemas de liberação controlada. (a) Administração convencional, (b) Administração por meio de sistemas liberação controlada, (A1, A2, A3, A4) Aplicação do fármaco. Fonte: (LYRA et al., 2007).

A composição dos carreadores do sistema controlado de fármacos é de natureza muito variada (lipídica, inorgânica e polimérica), dentre estes, o de natureza polimérica são os mais investigados e utilizados. Os carreadores devem ser escolhidos com base nas características físico-químicas do fármaco e via de administração. Entre os principais carreadores utilizados atualmente, destacam-se os lipossomas, as ciclodextrinas e as microesferas (LOPES; LOBO; COSTA, 2003; HENRIQUE, FALCARE, LOPES, 2006; PETITTI et al., 2008).

Entre as várias opções de material a ser utilizado na confecção dos carreadores destacam-se os polímeros, que são agentes versáteis e promissores. Eles são capazes de controlar a liberação do fármaco, sustentar a ação terapêutica ao longo do tempo e de liberar o fármaco ao nível de um determinado tecido ou órgão alvo, devido a sua boa estabilidade físico-química e biológica, e a ampla variedade de polímeros existentes, como naturais, sintéticos ou semissintéticos (VILANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Existem uma variedade de polímeros naturais biodegradáveis que podem ser utilizados para a preparação de sistemas poliméricos de transporte, tais como a albumina, os alginatos, a celulose, o amido e a quitosana. Porém, os polímeros naturais levam muito tempo para serem degradados. E desta forma, retarda a liberação do fármaco no organismo, além de apresentarem incompatibilidade com alguns constituintes das formulações (HANS; LOWMAN, 2002; SEVERINO et al., 2011; MARINHO et al., 2017).

Recentemente, os polímeros sintéticos biodegradáveis têm sido uma alternativa promissora por apresentarem facilidade de modificação de sua característica química, biocompatibilidade e diminuição dos efeitos tóxicos. E dentre eles destacam-se: os ácidos poliamino, poliamidas, poliacrilamidas, poliésteres, poliortoésteres e poliuretanos (JAIN, 2000; SEVERINO et al., 2011; MARINHO et al., 2017).

Os poliésteres alifáticos são polímeros biodegradáveis em meio biológico, derivados de ácidos graxos e não apresentam mutagenicidade, citotóxicidade e teratogenicidade. E por conta disso, são os polímeros sintéticos mais explorados nos sistemas de liberação controlada. São representados pelos poli (ácido láctico) PLA, poli (ácido glicólico) PGA, poli (caprolactona) PCL e copolímeros dos ácidos láctico e glicólico (PLGA) (JAIN, 2000; KOTWA et al., 2007; VILANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; SEVERINO et al., 2011).

Os copolímeros dos ácidos láctico e glicólico (PLGA) provocou um imenso interesse nos pesquisadores devido a suas propriedades favoráveis, tais como a boa biocompatibilidade, resistência mecânica e a biodegradabilidade, diminuindo as reações adversas decorrentes de fragmentos de degradação de longo período, desaparecendo logo depois de cumprir sua função, sem a necessidade de intervenções cirúrgicas para sua retirada (KOTWA et al, 2007;

VILANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; SEVERINO et al., 2011). Além disso, a utilização desse polímero em sistemas de liberação controlada já é aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) com comprovada segurança para uso em humanos (SOARES et al., 2005, MARINHO et al., 2017).

A cada dia são propostos novos sistemas inovadores baseados em polímeros sintéticos ou naturais. Os sistemas controlados por difusão são os mais comumente utilizados, como os sistemas reservatórios, que o princípio ativo se encontra aprisionado no interior de uma barreira de difusão inerte, como exemplo: os lipossomas, nanocápsulas, fibras ocas e microcápsulas; e sistemas matriciais ou monolíticos, que o princípio ativo encontra-se homogeneamente disperso ou dissolvido na matriz polimérica inerte, tais como: nanosferas e microesferas (Figura 10). (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; VILANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; COIMBRA, 2010; MARINHO et al., 2017).

Uma das opções bastante empregada na liberação controlada de fármacos são os sistemas matriciais por apresentarem vantagens, tais como: versatilidade, eficácia, baixo custo e produção que recorre a equipamentos e técnicas convencionais. Além disso, a utilização de sistemas matriciais permite a incorporação de quantidades relativamente elevadas de fármacos (CHIEN; LIN, 2002; FIALHO et al., 2003; LOPES; LOBO; COSTA, 2005; MRINHO et al., 2017).

2.3.1 Microesferas

As microesferas são sistemas que apresentam uma estrutura do tipo matricial em pequenas partículas sólidas e esféricas com tamanhos micrométricos, designadas como micropartículas porosas que promovem a liberação controlada do agente ativo (fármaco). Elas podem ser classificadas em homogêneas, quando o núcleo se encontra no estado molecular (dissolvido), ou em heterogênea, quando o núcleo se encontra no estado suspenso (na forma de partículas) (Figura 10). São constituídas de um sistema de matriz polimérica (natural ou sintética) contendo o fármaco uniformemente distribuído. (JAIN et al., 2000; MARINHO et al., 2017).

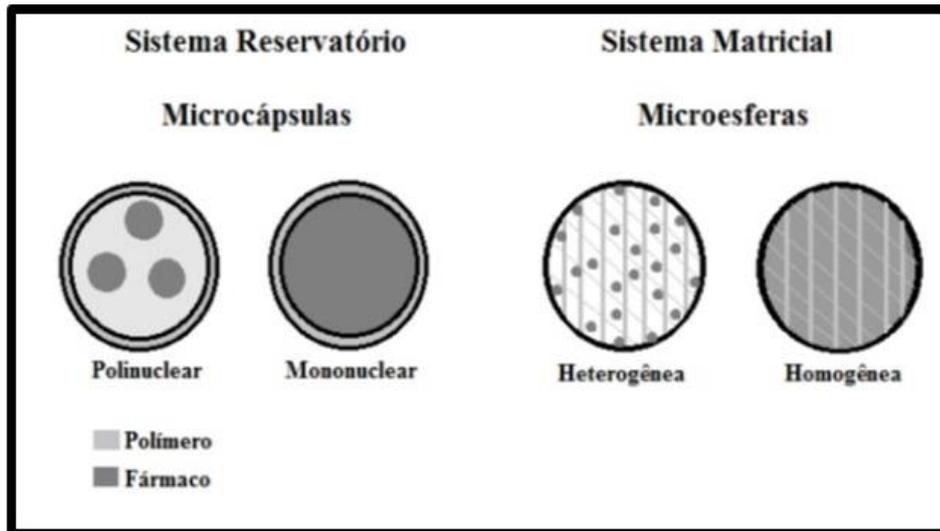


Figura 10: Estrutura dos diferentes tipos de micropartículas (Adaptado de Silva et al., 2003).

Nos últimos anos, o uso de microesferas poliméricas biodegradáveis tem se tornado um importante recurso para aumentar a eficácia terapêutica de fármacos. Pois, as microesferas apresentam uma administração fácil e não invasiva, protegendo o princípio ativo encapsulado (FREIBERG e ZHU, 2004; BERKLAND et al., 2004; RIBEIRO-COSTA et al 2009).

Estudos demonstram que as microesferas biodegradáveis podem ser empregadas na liberação de fármacos em doses desejadas e por implantação sem procedimentos cirúrgicos. A biocompatibilidade pode ser através da utilização de polímeros naturais, como celulose, quitina, e quitosana ou pelo emprego de polímeros feitos de monómeros naturais como ácidos lácticos e glicólicos (FREIBERG; ZHU, 2004).

Muitos compostos bioativos têm sido incorporados em microesferas, como exemplo temos o fármaco Huperzine A que foi encapsulado com microesferas de copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) no tratamento de pacientes com a doença de Alzheimer. Os testes *in vivo* demonstraram a capacidade das microesferas de PLGA em liberar o fármaco encapsulado durante duas semanas seguidas, conseguindo manter a concentração plasmática do Huperzine A em um nível constante (LIU et al., 2005).

O ácido úsnico foi avaliado encapsulado em microesferas na atividade antitumoral pela primeira vez por Ribeiro-Costa e colaboradores em 2004. Observou-se que o grupo tratado com o ácido na sua forma livre apresentou uma inibição de 42% das células tumorais em relação ao grupo controle, enquanto que uma inibição de 63% para o grupo tratado com o ácido encapsulado nas microesferas resultando na potencialização da atividade antitumoral do ácido úsnico na sua forma encapsulada com microesferas.

A ação do ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA foi avaliada na capacidade controlar a formação de biofilmes constituídos por *Staphylococcus aureus*. Os testes demonstraram uma excelente biocompatibilidade, sugerindo-os como uma alternativa para o desenvolvimento de melhores superfícies atóxicas resistentes a *S. aureus* a serem utilizadas em materiais hospitalares (GRUMEZESCU et al. 2014).

Marinho et al. (2017), realizaram estudos sobre toxicidade hepática de microesferas de PLGA contendo ácido úsnico de *Cladonia substellata* durante a prenhez de ratas Wistar. Nesse estudo foi demonstrado toxicidade do fármaco encapsulado, porém, em proporções bem menores do que as já encontradas para o ácido úsnico em sua forma livre.

2.4 CARTILAGEM HIALINA

A cartilagem hialina é um tecido conjuntivo especializado e mais frequente no corpo humano dentre os tipos de cartilagens. Este tecido cartilaginoso apresenta como principais funções: formar o primeiro esqueleto do embrião, proporcionar suporte aos tecidos moles e revestir as superfícies articulares (CHAMBERS et al., 2002; ATTUR et al., 2002; ALBANO et al., 2005; ATAYDE, 2011).

Este tecido desenvolve a partir do mesênquima, que se condensa para formar centros de formação de cartilagem. As células mesenquimais proliferam e se diferenciam em condroblastos que sintetizam a matriz orgânica da cartilagem, como as fibrilas colágenas, e ao mesmo tempo o tecido cartilaginoso é cercado por um tecido fibroso, o pericôndrio. O crescimento do tecido cartilaginoso acontece devido à diferenciação dos fibroblastos, que se encontram no pericôndrio e se transformam gradualmente em condroblastos caracterizando-se funcionalmente, como condrócitos (FLETCHER; WEBER, 2004; CHAMBERS et al., 2002).

Os condrócitos são células que se apresentam na periferia da cartilagem com forma alongada, enquanto mais profundamente, são arredondados e aparecem em grupos de até oito células, chamados grupos isógenos. Eles são os responsáveis pela síntese dos inúmeros componentes da matriz extracelular da cartilagem, como exemplo dos mais abundantes no tecido encontramos o colágeno e os proteoglicanos (CHAMBERS et al., 2002; ARRUDA, 2010; ATAYDE, 2011).

O colágeno e os proteoglicanos, são as principais macromoléculas presente na matriz extracelular do tecido cartilaginoso, representando respectivamente cerca de 10-30% e 5-10% do peso seco do tecido. São encontradas fibrilas colágenas dos tipos IX e XI, sendo as mais

abundantes as fibrilas do tipo II. Também são encontrados ácido hialurônico, pequenas quantidades de outras proteínas, lipídios e diversas glicoproteínas (VANWANSEELE, LUCCHINETTI, STÜSSI, 2002; ARRUDA, 2010).

A cartilagem hialina é formada principalmente pelo colágeno dos tipos II, IX e XI. O colágeno tipo II pertence à família dos colágenos formadores de fibras, sendo o mais abundante no tecido, constituindo cerca de 80-85% do conteúdo de colágeno na cartilagem. Este colágeno é formado por três cadeias do tipo $\alpha 1$ e do tipo $\alpha 2$ idênticas. Enquanto o colágeno do tipo IX é da família dos colágenos associados as fibrilas com tripla hélice ininterruptas e o tipo XI são heterotrímeros, ou seja, são formados por três cadeias α diferentes entre si, e juntos compõem cerca de 5 a 10% do conteúdo de colágeno no tecido. A função destes tipos de colágeno, é de se associar ao colágeno tipo II (dominante) e limitar o diâmetro da fibra para aproximadamente 15-30nm, como também as de outras proteínas não colágenas (GREGORY et al., 2000; ARRUDA, 2010).

O colágeno tipo XI retém um domínio globular não tripla hélice e se localiza em grande parte dentro da fibrila colágena tipo II ligado através de ligações cruzadas do tipo aldeído hidroxilisina. Devido às suas características moleculares e localização na fibrila colágenas, elas são fundamentais na fibrinogênese, uma vez que regula o diâmetro da fibrila impedindo a adição extra de colágeno tipo II, e assim garantindo a formação de fibrilas finas (ALBANO et al., 2005; ATAYDE, 2011).

Os proteoglicanos têm peso molecular de aproximadamente 2,5 milhões de daltons e são formados por vários elementos organizados numa complexa arquitetura aniônica com função de mola biológica. Sua unidade básica são os glicosaminoglicanos (GAG), que são altamente sulfatados, que conferem aos proteoglicanos propriedades hidrofílicas. Existem vários tipos de glicosaminoglicanos, porém na cartilagem são encontrados o sulfato de condroitina e o queratam sulfato. Estes são ligados a uma proteína central através de ligações covalentes, formando complexos denominados agregans, os quais se ligam ao ácido hialurônico através de proteínas de ligação (Figura 11) (FRANCO et al., 2009; DE SOUZA; DA SILVA, 2011).

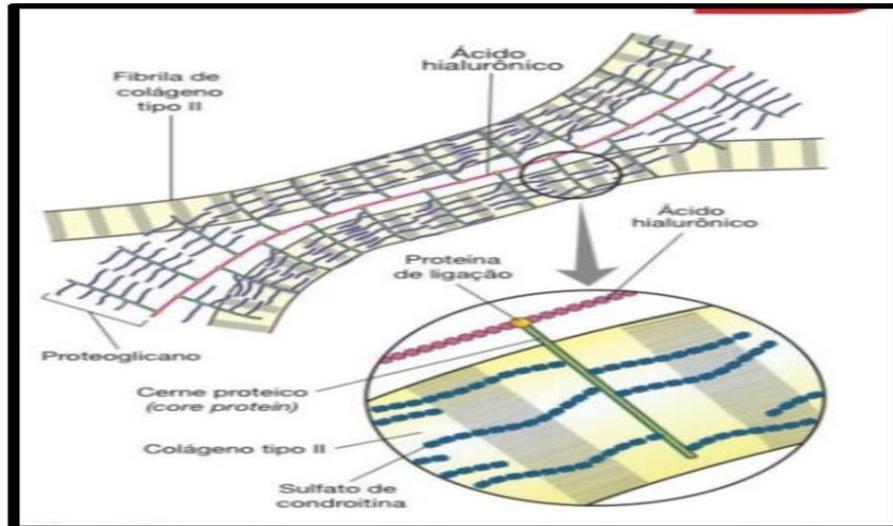


Figura 11: Representação esquemática da organização molecular da matriz extracelular da cartilagem hialina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A associação da água presente na cartilagem com os proteoglicanos confere ao tecido uma tendência expansiva, devido à pressão osmótica de pró-hidratação, que por sua vez é contida pela grande força de contenção exercida pela malha de fibras colágenas, criando uma considerável pressão de expansão dentro do tecido. A composição e a complexa organização ultraestrutural entre o colágeno e os proteoglicanos é o que garante as propriedades inerentes à cartilagem, como compressibilidade, elasticidade e autolubrificação dando resistência ao tecido (THEOCHARIS et al., 2010).

A matriz deste tecido também é composta por vários compartimentos que apresenta perfil morfológico e composição química diferentes. O compartimento adjacente a membrana dos condrócitos é denominado matriz lacunar ou pericelular, caracterizada pela ausência de organização do colágeno fibrilar. Em seguida, situa-se a matriz territorial ou capsular que é composta por uma rede de fibrilas de colágeno interligadas garantindo suporte aos condrócitos. O último e maior compartimento é a matriz interterritorial, a qual contém grande parte das fibras de colágeno e proteoglicanos (ATTUR et al., 2002; ALBANO et al., 2005; ARRUDA, 2010).

Sabendo-se da importância deste tecido, recentes estudos têm demonstrado que a administração de fármacos sobre a cartilagem hialina, principalmente em período crítico do desenvolvimento, tem causado sérios problemas, como exemplo temos os ensaios realizados por Basu e Wezeman (2000), com o ácido valpróico sobre o desenvolvimento embrionários de ratos, que afetou a expressão gênica das proteínas da matriz extracelular que constitui a cartilagem, apresentando alteração na condrogênese vertebral lombar dos fetos.

Em 2008, foram realizados estudos com a ciprofloxacina sobre os discos epifisários dos ossos longos de neonatos de ratos, que mostrou uma redução da cartilagem hialina do disco epifisário dos ratos expostos ao composto (CHANNA et al., 2008).

Parcelli et al. (2015), realizou experimentos em animais de idade juvenil submetidos a isotretinoína. Este estudo, comprovou interações negativas do fármaco na cartilagem hialina durante o desenvolvimento ósseo, como lentidão no processo de proliferação dos condrócitos. Este estudo comprova a vulnerabilidade deste tecido quando exposto a substâncias tóxicas.

Outro estudo que indica a vulnerabilidade da cartilagem a substâncias tóxicas, é o realizado por Silva (2017), que ao administrar o ácido úsnico sobre a prole de ratas Wistar durante a prenhez relatou uma redução significativa das áreas das zonas de proliferação e hipertrófica, e diminuição de colágeno na cartilagem hialina dos membros anteriores e posteriores dos fetos expostos ao composto

2.5 OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRALE

O sistema esquelético origina-se de células do mesoderma e da crista neural. Quando a notocorda e o tubo neural se formam, o mesoderma intraembrionário lateral a estas estruturas, se espessam, formando duas colunas de mesoderma paraxial. Estas colunas tornam-se segmentadas em blocos de tecidos mesodérmico, os somitos, que aparecem externamente como elevações arredondadas ao longo da superfície dorsolateral do embrião. E a ossificação do sistema esquelético envolve dois processos distintos de osteogênese, que é a ossificação intramembranosa e a ossificação endocondral (SERRANO et al., 2006; TRUJILLO, 2007.)

A ossificação endocondral é a principal responsável pelo desenvolvimento dos ossos curtos e longos, apresenta um alto grau de remodelamento e exerce uma grande função metabólica. Este tipo de ossificação depende da proliferação e diferenciação da cartilagem hialina para sua formação. (VELOSA et al., 2003; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; PARCELLI et al., 2015).

Na histogênese da ossificação endocondral, o broto dos membros é formado quando o mesoderma somático induz a proliferação da placa mesoderma lateral, constituindo as primeiras condensações de células mesenquimais. As células mesenquimais indiferenciadas iniciam um processo de proliferação, condensação e diferenciação em condroblastos, os quais caracterizam-se funcionalmente, como condrócitos e sintetizam a matriz extracelular do tecido

cartilaginosa do tipo hialina com aspecto de um futuro osso. Desta forma, a cartilagem é circundada por uma delgada camada de tecido ósseo, depositada sob o pericôndrio, que se transforma em periósteo restringindo a passagem de substâncias nutritivas para os condrócitos da região central da cartilagem, sendo a mesma nutrida por difusão. Os condrócitos hipertrofiam, entram em apoptose e ocorre a mineralização da matriz. Os capilares atravessam o periósteo, penetram na cartilagem calcificada levando consigo as células progenitoras hematopoiéticas que se diferenciam em células clásticas e reabsorvem parcialmente a cartilagem calcificada. Com os vasos sanguíneos também chegam células osteoprogenitoras originadas do periósteo, que ocupam as cavidades deixadas pelos condrócitos, entram em divisão mitótica e se diferenciam em osteoblastos, que sintetizam a matriz orgânica do tecido ósseo. E assim, forma tecido ósseo no centro de ossificação primário (diáfise) (Figura 12) (OLSEN et al., 2000; KRONENBERG, 2003; SERRANO et al., 2006; TATARCZUCH; MIRAMS, 2011; ARANA, 2013; LONG; ORNITZ, 2013).

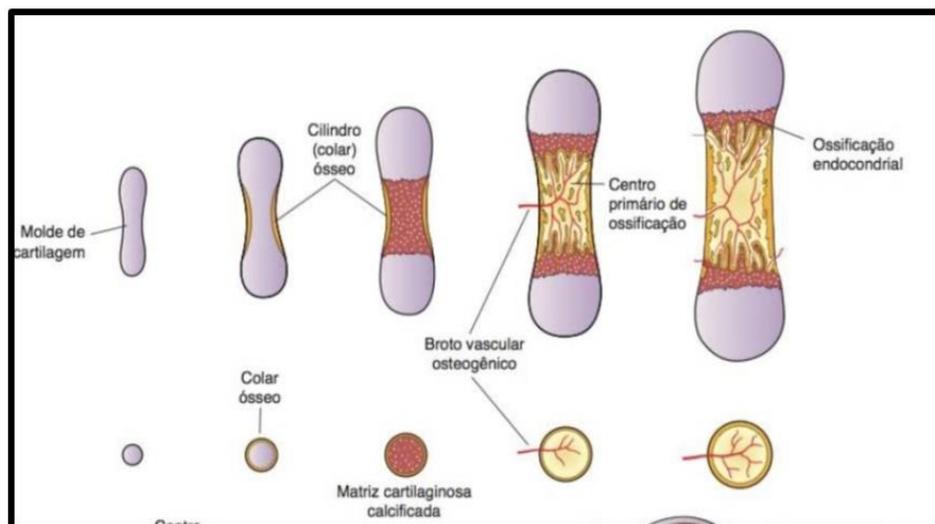


Figura 12: Representação esquemática da formação do osso longo a partir de um modelo cartilaginoso (JUNOUEIRA; CARNEIRO. 2013).

No desenvolvimento dos ossos longos, entre a epífise e a diáfise, observa-se um disco de tecido cartilaginoso, o disco epifisário, que é o responsável pelo crescimento longitudinal do osso durante sua formação. Este disco cartilaginoso distingue-se em várias regiões anatômicas, como a zona de repouso, que apresenta os condrócitos aparentemente dispersos e inativos; a zona de proliferação, onde os condrócitos entram em divisão mitótica e formam colunas paralelas; zona hipertrófica, que apresenta condrócitos volumosos e núcleos evidentes; zona calcificada, onde os condrócitos entram em apoptose e ocorre a mineralização e a zona ossificada, apresentando tecido ósseo (Figura 13). O desaparecimento deste disco determina a

parada do crescimento dos ossos, quando eles atingem seu tamanho máximo (figura 12). (ASZÓDI et al., 2000; PIZAURO et al., 2002; JUDAS et al., 2012; DOLCI, 2016).

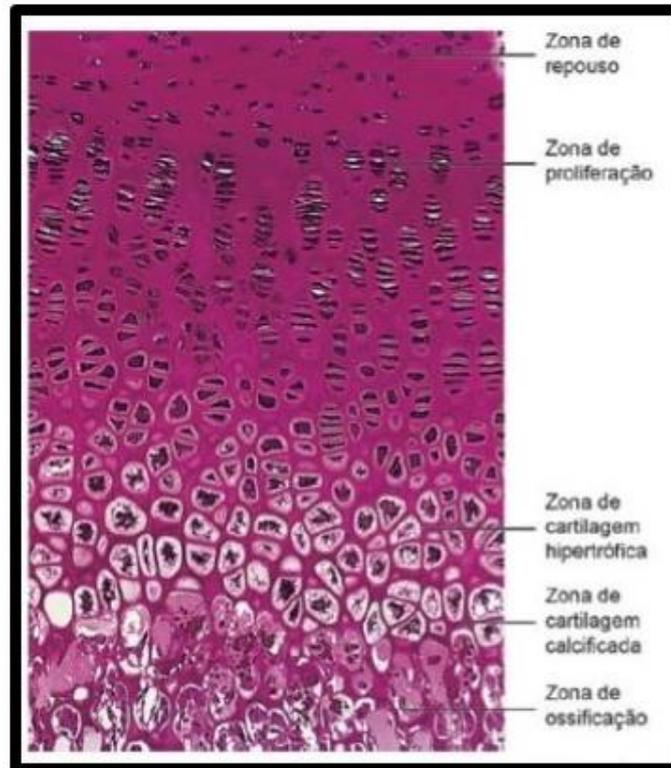


Figura 13: Fotomicrografia do disco epifisário, demonstrando as cinco zonas. Coloração: Pararosanilina e Azul de toluidina. Pequeno aumento (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As diáfises (centro de ossificação primário), ao nascimento já estão bastante ossificadas. Enquanto, as epífises (centro de ossificação secundário), ainda é cartilaginosa. Grande parte dos centros secundários de ossificação aparecem nas epífises durante os primeiros anos após o nascimento. A ossificação se espalha em todas as direções, onde ocorre o desaparecimento do disco cartilaginoso, e somente persiste a cartilagem articular (TRUJILLO, 2007; JUDAS et al., 2012).

Os três componentes principais do tecido ósseo são as células osteogênicas, a matriz orgânica e inorgânica. As células osteogênicas cumprem um papel fundamental, como os osteoblastos, que são os responsáveis pela síntese da parte orgânica da matriz óssea. E dentre as proteínas sintetizadas pelos osteoblastos estão os colágenos, principalmente, fibras colágenas do tipo I e proteínas não colágenas, como osteopontina, osteocalcina e a sialoproteína óssea, entre outras. Eles são responsáveis não só pela formação da matriz óssea, mas também pela sua mineralização. Os osteócitos, que são células altamente ramificadas localizadas em lacunas ósseas, comunicando entre si e com as células da superfície óssea, através de uma rede de

canalículos, que permitem a passagem de nutrientes e de muitas outras substâncias e fornecendo manutenção a matriz. Enquanto, os osteoclastos que são células de origem hematopoiética, gigante e multinucleada desempenham uma função essencial na remodelação e na renovação do tecido ósseo (JUDAS et al., 2012; DOLCI, 2016).

Na matriz orgânica deste tecido as fibras colágenas é o componente mais abundante, principalmente, as fibras colágenas do tipo I, os demais tipos de fibras colágenas, como III, IV e VII aparecem em uma menor quantidade. Estas fibras conferem ao osso uma grande capacidade de resistências às forças de tensão. Além disso as fibras colágenas participam da diferenciação, adesão, migração e proliferação celular. Enquanto na matriz inorgânica quem predomina são os cristais de fosfato de cálcio depositados como hidroxapatita, que junto com as fibras colágenas conferem ao tecido ósseo propriedades biomecânicas únicas, bem como elasticidade ao tecido e a capacidade de resistência à propagação de fissuras. Os cristais de hidroxapatita proporcionam ao tecido uma elevada dureza e resistência à compressão (TRUJILLO, 2007; KEDE; SABATOVICH, 2009; ATAYDE, 2011).

Segundo Serrano et al. (2006) a ossificação endocondral envolve processos influenciados por vários fatores, como endócrinos nutricionais, celulares histológicos e bioquímicos. Portanto, a administração de drogas durante o desenvolvimento deste tipo de ossificação pode acarretar diversos tipos de perturbações, como malformações dos membros, visto que é um processo bem complexo e controlado.

Experimentos realizados com a isotretinoína (ácido 13-cis-retinóico), um derivado da vitamina A, que apresenta algumas propriedades farmacológicas semelhantes ao ácido úsnico, demonstraram efeitos indesejáveis na administração deste composto durante o processo de ossificação endocondral em ratos jovens, como lentidão no processo de proliferação celular, na produção da matriz osteóide, na formação da epífise, diáfise, periósteo e mineralização óssea. (PARCELLI et al., 2015; CAJUEIRO et al., 2014). Este estudo demonstra a vulnerabilidade do processo de ossificação endocondral quando expostos a substâncias tóxicas.

2.6 COLÁGENO TIPO I

O colágeno tipo I é o principal componente estrutural da matriz extracelular. Este tipo de colágeno é formado por três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias α , arranjadas numa conformação de tripla hélice, a qual se estabiliza por pontes de hidrogênio, conferindo à molécula alta estabilidade, rigidez e forma de bastão. Cada uma das cadeias de colágeno possui

uma sequência de aminoácidos característica, além de uma série de repetições da sequência de aminoácidos Glicina-X-Y, no qual X é frequentemente prolina e Y hidroxiprolina, também podendo ser ocupadas por outra sequência de aminoácidos naturais. As cadeias peptídicas do tipo $\alpha 1$ e uma do tipo $\alpha 2$ (Figura 14) possuem sequências adicionais de 15 a 20 aminoácidos que não fazem parte da tripla hélice e que são denominadas de telepeptídeos, também conhecidos como extensão não colagenosa da molécula. Existem duas extensões, a aminoterminal (NH_2) e a carboxiterminal (COOH). O domínio COOH contém informações essenciais para a formação da tripla hélice, enquanto o NH_2 apresenta informações importantes para a regulação final do diâmetro das fibras (KEDE; SABATOVICH, 2009).

O colágeno é sintetizado no retículo endoplasmático granuloso das células sintetizadoras desta proteína. São sintetizadas cadeias polipeptídicas, que são liberadas na matriz extracelular como um precursor solúvel, o procolágeno, que sofre ação proteolítica para formar as fibras insolúveis de colágeno. Este apresenta duas grandes extensões de peptídeos: aminoterminal (NH_2) e carboxiterminal (COOH), chamados de peptídeos de registro. Após a secreção na matriz extracelular os peptídeos são removidos por proteases específicas chamadas procolágeno peptidases dando origem a uma tripla hélice (tropocolágeno) com cerca de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, que se agregam e formam fibrilas e se organizam em fibras colágenas (Figura 15) (CHOI et al., 2007; HYNES, 2009; RODRIGUES, 2009).

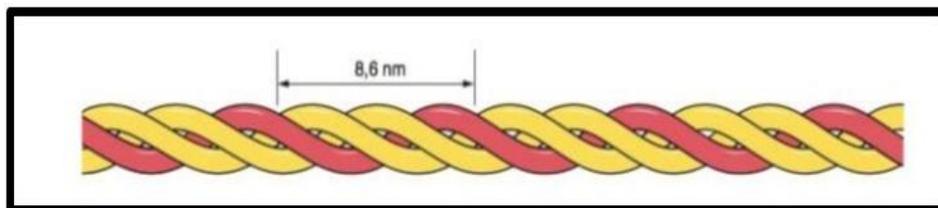


Figura 14: Representação esquemática da tripla hélice. Cadeias peptídicas do tipo $\alpha 1$ (amarelo), cadeia peptídica do tipo $\alpha 2$ (vermelho). Barra demonstra distância (8,6nm) de uma volta completa da hélice (JUNOUEIRA; CARNEIRO. 2013).

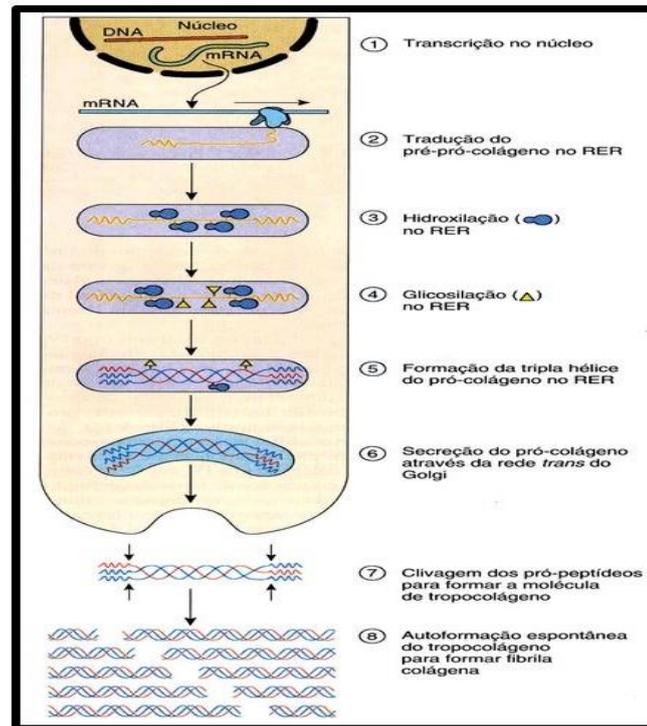


Figura 15: Representação esquemática das etapas da biossíntese do colágeno (GREGÓRIO, 2011).

Na sua composição química os aminoácidos mais significativos consistem em: 33% de Glicina, 12% de Prolina e 11% de hidroxiprolina, 0,7% de Hidroxilisina. Os resíduos de Tirosina encontram-se exclusivamente na região dos telopeptídeos, que correspondem as regiões não helicoidais do tropocolágeno. Enquanto os aminoácidos polares correspondem a quase 40% da molécula, 11% são básicos e 9% são ácidos, os demais 17% correspondem a aminoácidos hidroxilados. Aproximadamente 4% dos resíduos correspondem a amidas de aspartato e glutâmico (Glu). Uma característica que diferencia o colágeno de outras proteínas é a presença de alta concentração de glicina seguida de prolina e hidroxiprolina que tem origem através da hidroxilação dos resíduos de lisina e prolina após o processo de tradução (GOISSIS, 2007; RODRIGUES, 2009).

Esta fibra colágena apresenta uma unidade física conhecida como “período D”, a qual tem participação no controle de eventos biológicos que dependem da adesão celular sobre a matriz extracelular para desencadear a expressão da atividade. Este “período D” é caracterizado por apresentar uma distribuição ordenada de aminoácidos que tem origem na interação particular das moléculas de tropocolágeno para formação das estruturas fibrilares que compõem a tripla hélice. Estas interações são dependentes das alterações bioquímicas, assim como da ação mecânica sobre os tecidos. Estes processos são afetados pela simples presença da sequência de aminoácidos arginina, glicina e aspartato na estrutura primária do colágeno tipo I,

ou em outras proteínas na matriz extracelular, como a fibronectina. Esta sequência de aminoácidos é um dos determinantes mais importante para adesão celular da matriz extracelular (CHOI et al., 2007; HYNES, 2009; RODRIGUES, 2009).

Existem uma variedade de tipos de colágenos, sendo o colágeno do tipo I o mais importante. Estudos têm demonstrado que o colágeno do tipo I não é responsável somente pela manutenção da integridade da maioria dos tecidos, mas também pela funcionalidade dos tecidos por ter uma interação com as células presentes na matriz extracelular (GOISSIS, 2007; HAY, 2013).

O colágeno tipo I representa 90% do colágeno existente, estimou superficialmente que o número de monômeros de colágeno tipo I no homem adulto é de cerca de 10^{21} unidades, sendo a molécula biológica com maior número de domínios funcionais existente no reino animal (GOISSIS, 2007).

A parte orgânica da matriz extracelular do tecido ósseo é formada principalmente por fibras colágenas do tipo I. As moléculas de colágeno estão unidas por três resíduos do aminoácido hidroxilisina, lisina ou seus derivados de maneira que cada duas moléculas de colágeno estão unidas entre si por uma estrutura cíclica fluorescente chamada piridinolina (GOISSIS, 2007; RODRIGUES, 2009).

Pesquisas relatam que administração de drogas tóxicas, como exemplo o ácido úrico podem afetar a estrutura do colágeno pela oxidação ou pela degradação proteolítica modificando sua atividade de crescimento e indução da proliferação celular (VARANI et al., 2006).

Estudos realizados com pefloxacina sobre os tendões de Aquiles de camundongos, demonstraram danos oxidativos nas cadeias α 1 e α 2 do colágeno tipo I e conseqüentemente, uma diminuição da síntese de colágeno nos tendões dos camundongos (SIMONIN, et al., 2000).

Experimentos realizados com a indução da TNF- α sobre fibroblastos cultivados apresentaram diminuição na transcrição do gene do colágeno, nos níveis de mRNA do colágeno e na produção de colágeno através dos fibroblastos cultivados, causando uma inibição de quase 50% da síntese de colágeno tipo I (SOLIS-HERRUZO et al., 2005). Estes estudos, demonstram a importância do colágeno, principalmente, do colágeno tipo I para o desenvolvimento dos tecidos, e como também mostra a vulnerabilidade dessas fibras a substâncias tóxicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL LIQUÊNICO

O líquen *Cladonia substellata* (AHTI) foi coletado no Município de Mamanguape sob as coordenadas (06° 50' 19" S 35° 07' 34" W), no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. O ácido úsnico, substância principal do estudo, foi isolado, purificado e caracterizado conforme metodologia pré-estabelecida no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.2 PREPARAÇÃO DE MICROESFERAS DE PLGA CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO

As microesferas foram preparadas pelo método de emulsão múltipla com evaporação do solvente de acordo com Ribeiro-Costa et al. (2004), em parceria com o Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-LIKA/UFPE. Uma emulsão simples A/O foi preparada dissolvendo-se 450 mg de PLGA e 10 mg de ácido úsnico em 12 mL diclorometano. A solução orgânica foi emulsificada (Ultra-Turrax T25, IKA, Alemanha) com 400 mg de PEG em água por 60 segundos a 8.000 rpm utilizando banho de gelo. A emulsão formada foi adicionada a uma fase aquosa constituída por 50 mL de PVA 0,5% e emulsificada por 30 s a 8.000 rpm, resultando em uma emulsão múltipla A/O/A. A emulsão resultante foi mantida sob agitação mecânica em um agitador de palheta a 400 rpm por 4h para evaporação do solvente. As microesferas foram recuperadas através de centrifugação (centrífuga Kubota KN-70, Japão) a 3.000 rpm durante 10 min, lavadas três vezes com 25 mL de água destilada e dispersas no crioprotetor trealose 1% (m/v). Em seguida, as microesferas foram congeladas a -80°C por 48h para liofilização (EZ-DRY, FTS System, EUA). Após liofilização, as microesferas foram acondicionadas em dessecador a 25 °C ± 1 °C.

3.3 ENSAIOS DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS MICROESFERAS DE PLGA

A eficiência de encapsulação do ácido úsnico nas microesferas foi determinada por espectrofotometria (Ultrospec 3000 Pro, Amersham Pharmacia Biotech, EUA). Amostras de microesferas liofilizadas (11,5 mg) foram diluídas em 25 mL de uma mistura de diclorometano e metanol (3:2) e submetidas à sonicação durante 10 min. Uma alíquota da solução foi diluída até a concentração teórica de 6 µg.mL⁻¹. O ácido úsnico foi determinado em 254 nm de

comprimento de onda, utilizando-se curva padrão na faixa de concentração de 2-14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em acetonitrila. Microesferas da formulação placebo foram submetidas ao mesmo método de doseamento para demonstrar a ausência de interferência dos constituintes da formulação. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas 12 ratas Wistar fornecidas pelo biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, pesando cerca de 250-300 g, virgem e com 60 dias de vida. Foram analisados seis animais de cada prole em estudo totalizando 72 fetos analisados. Os animais foram mantidos em gaiolas enfileiradas com ambiente climatizado em fotoperíodo (12 horas claro/12 horas escuro) a uma temperatura controlada de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ com exaustão de ar, e livre acesso de alimento *ad libitum* e água durante os experimentos. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 23076.029828/2013-94).

3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Inicialmente, as fêmeas foram submetidas ao estudo do ciclo estral, no intuito de se determinar o período fértil. Após a confirmação do período de ovulação, as fêmeas foram pareadas com machos (2:1), *overnight*, e o acasalamento confirmado no dia seguinte com a presença do "plug" (massa esbranquiçada de espermatozoides na abertura vaginal) ou pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. As primeiras 24 horas após a confirmação do acasalamento foram consideradas como dia zero de gestação (D0).

As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente no grupo controle (n=6) e tratado (n=6). Os animais do grupo controle receberam 1,0 ml de solução fisiológica, enquanto os do grupo tratado receberam uma solução com ácido úsnico purificado na dose de 25 mg/kg de peso corporal diluído em 1,0 ml de solução fisiológica. Dose calculada com base no estudo da DL50 (Dose Letal que mata 50% dos animais). A administração foi do 6º ao 15º dia de gestação, por via oral (gavagem), dose diária.

No final da gestação as fêmeas foram eutanasiadas pela administração de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) associado ao Tiopental (100 mg/kg), por via intramuscular. O procedimento de cesárea foi realizado para abertura do útero de cada fêmea e a retirada dos fetos. Em seguida, os fetos foram eutanasiados e realizado a coleta dos seus membros anteriores e posteriores.

3.6 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS

Para registro de anormalidade nos membros anteriores e posteriores dos fetos, foram analisados os discos epifisários e a quantidade de colágeno do tipo I presente no fêmur dos membros posteriores e no úmero dos membros anteriores dos fetos de cada prole em estudo. Após a eutanásia dos fetos, os membros anteriores e posteriores foram coletados e submetidos a análise histológica. O material foi mantido em formaldeído a 10% neutro tamponado (NBF) por 24 horas, processados e submetidos a técnica histológica de rotina para inclusão em parafina. Os blocos obtidos foram cortados em 4 μm de espessura, corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Picrosirius Red. Em seguida, as lâminas coradas com H&E foram fotografadas e analisadas em aumento total 40X, 100X e 400X através do programa Motic® Imagens Plus 2.0 com uma câmera digital acoplada ao computador e ao microscópio óptico (Olympus BH-2, Japan). Enquanto, as lâminas coradas com Picrosirius Red foram fotografadas e analisadas na objetiva de 40X através do programa ISCapture (versão 4.1) com uma câmera digital acoplada ao computador e ao microscópio óptico (Lumen-LM3100TLi) com sistema de polarização de luz. Foram obtidas das preparações histológicas 10 fotomicrografias em cada aumento.

Para análise morfométrica das fotomicrografias foram submetidas às devidas mensurações, utilizando o software *ImageJ* versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Para obter a área das zonas de proliferação e hipertrófica foi mensurada a área total da cartilagem hialina em transição (processo de ossificação endocondral), e em seguida foram mensuradas as áreas de proliferação e hipertrófica dos condrócitos. Os valores das referentes áreas foram divididos pelo o valor da área total da cartilagem hialina obtendo a porcentagem de cada área. Na obtenção da quantidade de condrócitos na zona de proliferação e na zona hipertrófica foi quantificado os condrócitos presente em cada fotomicrografia referente a cada zona. Na mensuração da área celular dos condrócitos em proliferação e hipertróficos foram mesuradas 1000 células de cada grupo em micrômetros quadrados (μm^2). Na quantidade de colágeno do tipo I presente no tecido ósseo foi obtido o percentual de colágeno presente em cada fotomicrografia. As fibras de colágeno presente foram quantificadas através da seleção de tonalidades birrefringentes avermelhadas ou alaranjadas, correspondente às bandas de colágeno polarizadas do tipo I (MONTES; JUNQUEIRA, 1991).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizado o teste estatístico de anormalidade *Kolmogorov-Smirnov*, e em seguida os dados foram avaliados estatisticamente através do teste U de *Mann-Whitney* (software SPSS, versão 15.0), com significância $p < 0,05$. Os resultados experimentais estão expressos no formato de média \pm desvio padrão (DP).

4 RESULTADOS

4.1 OBSERVAÇÃO HISTOLÓGICA DA OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRAIS DOS MEMBROS ANTERIORES E POSTERIORES DOS NEONATOS.

A figura 16 (A e B) mostra o desenvolvimento da ossificação endocondral dos membros anteriores e posteriores da prole de ratas Wistar do grupo controle (A) e tratado na dose de 25 mg/kg/dia de ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA por via oral (B). Nas observações histológicas dos membros anteriores e posteriores os centros de ossificação secundários (epífises) dos neonatos exibiram molde de cartilagem hialina intacta (setas) no grupo tratado (Figura 16 B), em relação ao grupo controle foram similares (Figura 16 A). Como também os centros de ossificação primários (diáfises) apresentaram totalmente ossificados (cabeça de setas) em ambos os grupos (Figura 16 A e B).

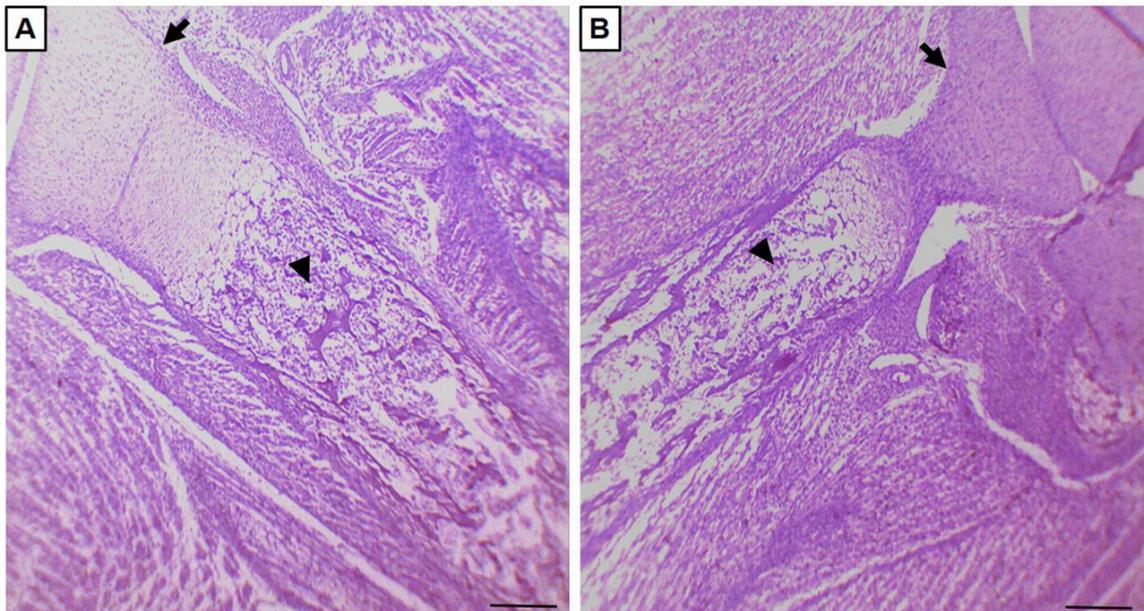


Figura 16. Fotomicrografia do fêmur da prole de ratas Wistar do grupo controle (A) e grupo tratado com ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (B). Visualização das epífises em molde de cartilagem hialina (setas), diáfise com tecido ósseo (cabeça de seta). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra de Escala: 100 μ m.

4.2 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DAS ZONAS DO DISCO EPIFISÁRIO DOS MEMBROS ANTERIORES E POSTERIORES DOS NEONATOS.

Os resultados das observações histológicas das zonas do disco epifisário dos membros anteriores e posteriores da prole de ratas Wistar estão representados na figura 17 (A e B). No disco epifisário foi observado cinco zonas: zona de repouso contendo condrócitos com formato arredondado, situados em lacunas envolvido na matriz cartilaginosa, dispersos e sem alteração morfológica (asteriscos); zona de proliferação com os condrócitos em multiplicação mitótica apresentando um formato achatado, formando colunas longitudinais e paralelas entre si (setas menores); a zona hipertrófica com condrócitos com formato arredondado, bastante volumosos, núcleos bem evidentes e entre eles células entrando em apoptose (barras); zona calcificada onde observamos o seu começo com o término da apoptose e a deposição de minerais para a composição do tecido ósseo (setas maiores); e em seguida a zona de ossificação constituída de osteoblastos com um formato cuboide e situado na periferia do tecido, os osteócitos com um formato achatado e situados em lacunas no interior da matriz (cabeças de setas). Em síntese, nas zonas do disco epifisário dos membros anteriores e posteriores dos neonatos não foram observadas alteração morfológica do grupo tratado, quando comparado ao grupo controle.

Na avaliação histomorfométrica da área das zonas de proliferação (setas menores) e hipertrófica (barras) do disco epifisário representadas na figura 17 não foi observado diferenças significativas entre os grupos analisados. A tabela 1 expressa os valores quantitativos da área das referentes zonas.

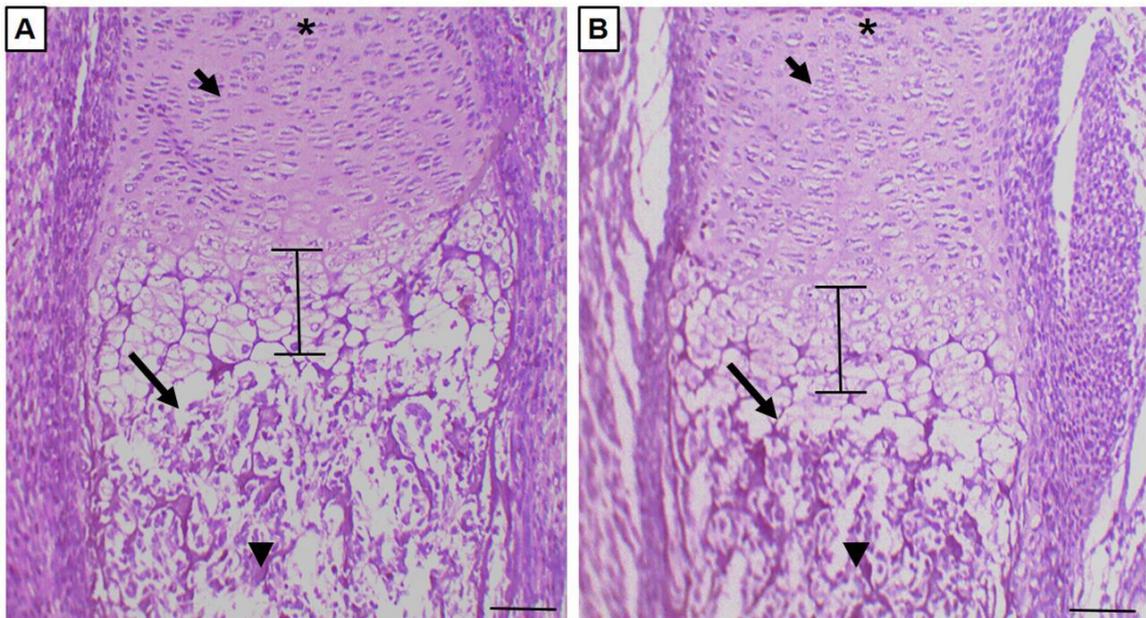


Figura 17. Fotomicrografia do disco epifisário do fêmur da prole de ratos Wistar do grupo controle (A) e grupo tratado com o ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (B). Visualização da zona de repouso (asterisco), zona de proliferação dos condrócitos (setas menores), zona de condrócitos hipertróficos (barras), zona calcificada (setas maiores), zona de ossificação (cabeças de setas). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra de Escala: 100 μ m.

Tabela 1 Avaliação histomorfométrica da área das zonas de proliferação e hipertrófica do disco epifisário dos membros anteriores e posteriores dos neonatos expostos ao ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (tratado) e do grupo controle. Dados expressos com média \pm desvio padrão (DP).

Membros	Zonas mensuradas (%)	Grupo Controle (Média \pm DP)	Grupo Tratado (Média \pm DP)	Valor- p
Anteriores	Proliferação	48,34 \pm 8,34	49,30 \pm 9,35	0,354
	Hipertrófica	51,65 \pm 8,34	50,69 \pm 9,35	0,357
Posteriores	Proliferação	47,59 \pm 8,20	49,14 \pm 8,09	0,595
	Hipertrófica	52,40 \pm 8,20	50,85 \pm 8,09	0,595

4.3 AVALIAÇÃO HISTOMOFORMÉTRICA DOS CONDRÓCITOS NAS ZONAS DE PROLIFERAÇÃO E HIPERTRÓFICA DO DISCO EPIFISÁRIO DOS MEMBROS ANTERIORES E POSTERIORES DOS NEONATOS.

Nos resultados da área celular dos condrócitos em proliferação (Figura 18 B) e hipertróficos (Figura 19 B) no disco epifisário dos membros anteriores e posteriores dos fetos do grupo tratado apresentaram diferenças significativas ($p=0,001$) em relação ao grupo controle (Figura 18 A, 19 A). A tabela 2 expressa os valores quantitativo da área celular dos condrócitos em proliferação e hipertróficos.

Na avaliação do número de condrócitos hipertróficos no disco epifisário dos membros anteriores e posteriores dos fetos no grupo tratado (Figura 19 B), não foi observado diferenças significativas ($p=0,269/0213$) em relação ao grupo controle (Figura 19 A). Entretanto, houve diferenças significativas ($p=0,001$) no número de condrócitos em proliferação no grupo tratado (Figura 18 B), quando comparado com o grupo controle (Figura 18 A). Os respectivos valores estão descritos na tabela 3.

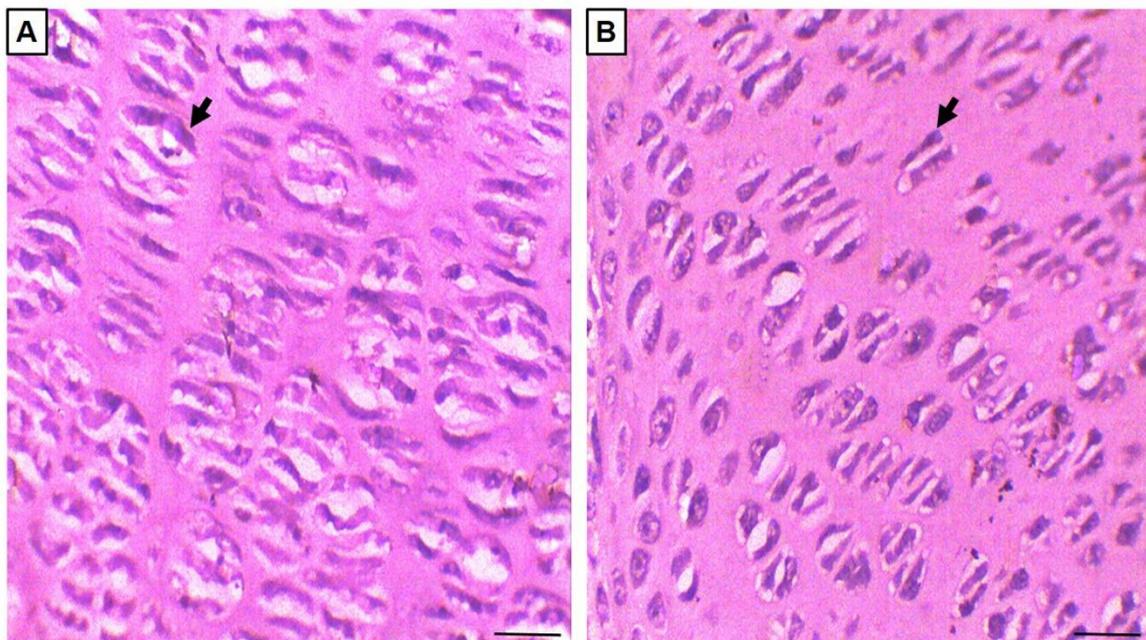


Figura 18. Fotomicrografia dos condrócitos em proliferação (setas) no disco epifisário do fêmur da prole de ratas Wistar do grupo controle (A) e grupo tratado com ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (B). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra de Escala: 100 μ m.

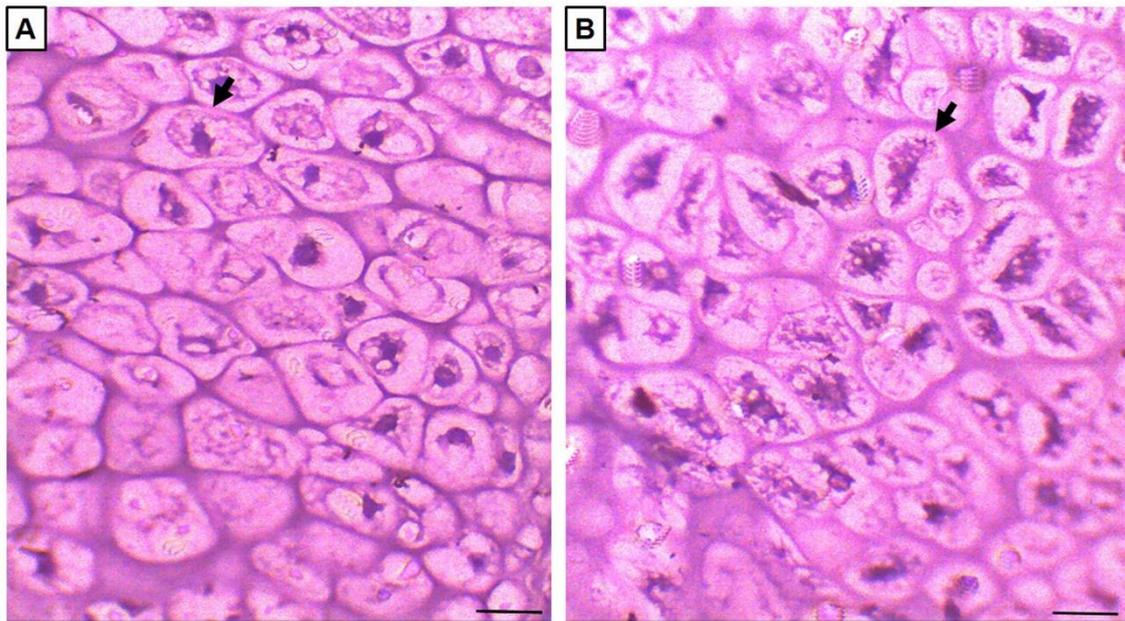


Figura 19. Fotomicrografia dos condrócitos hipertróficos (setas) do disco epifisário do fêmur da prole de ratas Wistar do grupo controle (A) e grupo tratado com ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (B). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra de Escala: 100 μ m.

Tabela 2. Avaliação da área (μm^2) celular dos condrócitos presentes nas zonas de proliferação e hipertrófica do disco epifisário dos membros dos neonatos expostos ao ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (tratado) e do grupo controle. Dados expressos

Membros	Zonas de mensuração	Grupo Controle (Média \pm DP)	Grupo Tratado (Média \pm DP)	Valor- p
Anteriores	Proliferação	81,75 \pm 22,46	74,30 \pm 19,65	0,001
	Hipertrófica	50,52 \pm 10,61	49,03 \pm 8,72	0,269
Posteriores	Proliferação	84,58 \pm 18,92	76,40 \pm 18,85	0,001
	Hipertrófica	52,66 \pm 8,72	50,39 \pm 8,26	0,213

Tabela 3. Análise do número de condrócitos nas zonas de proliferação e hipertrófica do disco epifisário dos membros de neonatos expostos ao ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (tratado) e do grupo controle. Dados expressos com média \pm desvio padrão (DP).

Membros	Zonas de mensuração (μm^2)	Grupo Controle (Média \pm DP)	Grupo Tratado (Média \pm DP)	Valor- p
Anteriores	Proliferação	76,55 \pm 21,24	60,22 \pm 18,63	0,001
	Hipertrófica	401,66 \pm 92,65	337,32 \pm 68,25	0,001
Posteriores	Proliferação	76,46 \pm 20,43	66,18 \pm 19,41	0,001
	Hipertrófica	385,44 \pm 90,03	315,69 \pm 64,37	0,001

4.4 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DAS FIBRAS DE COLÁGENO TIPO I PRESENTE NO TECIDO ÓSSEO DOS MEMBROS ANTERIORES E POSTERIORES DOS NEONATOS.

Na matriz extracelular do tecido ósseo das diáfises foi observado fibras colágenas tipo I (setas) estendidas por toda a extensão em paralelo entre si, com tonalidades birrefringentes avermelhadas tanto no grupo tratado (Figura 20 B e 21 B) como no grupo controle (Figura 20 A e 21 A). A tabela 4 representa a análise histomorfométrica das fibras colágeno do tipo I (figuras 20 e 21 - setas) nos membros anteriores e posteriores dos neonatos do grupo tratado e controle. Os membros anteriores do grupo tratado não apresentaram diferenças significativas, quando comparado ao controle ($p= 0,172$). Por outro lado, nos membros posteriores do grupo tratado mostraram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p= 0,001$).

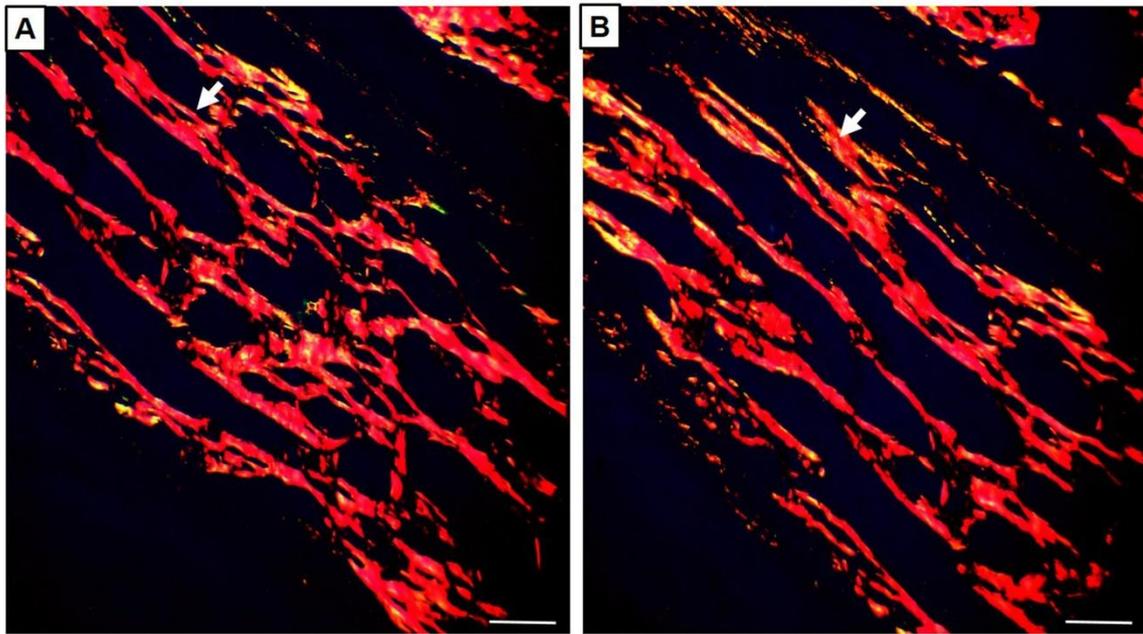


Figura 20. Fotomicrografia das fibras de colágeno tipo I (setas) presente no tecido ósseo do úmero da prole de ratas Wistar do grupo controle (A) e grupo tratado com ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (B). Coloração Picosirius Red. Barra de Escala: 100 μ m.

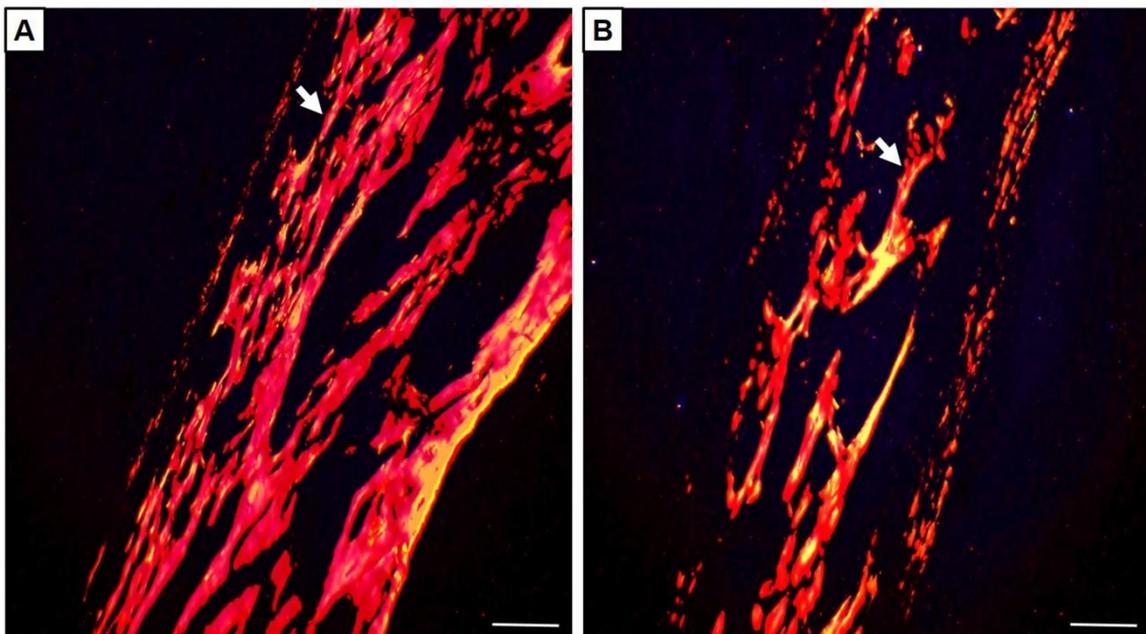


Figura 21. Fotomicrografia das fibras de colágeno tipo I (setas) presente no tecido ósseo do fêmur da prole de ratas Wistar do grupo controle (A) e grupo tratado com ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (B). Coloração Picosirius Red. Barra de Escala: 100 μ m.

Tabela 4. Avaliação histomorfométrica das fibras colágenas tipo I presente no tecido ósseo dos membros de neonatos expostos ao ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (tratado) e do grupo controle. Dados expressos com média \pm desvio padrão (DP).

Membros	Grupo Controle (Média \pm DP)	Grupo Tratado (Média \pm DP)	Valor- p
Anteriores	5,04 \pm 3,22	4,49 \pm 2,96	0,172
Posteriores	4,71 \pm 3,29	3,35 \pm 2,35	0,001

5 DISCUSSÃO

Ensaio preliminares da toxicidade reprodutiva do ácido úsnico durante o período gestacional relatam relevantes sinais de toxicidade na prole de ratas prenhes tratadas com o composto na sua forma livre na dose de 25 mg/kg/dia por via oral, como a presença de malformações dos membros anteriores e posteriores dos neonatos. Este estudo demonstra a capacidade do ácido úsnico de promover o aparecimento de anormalidades no desenvolvimento anatômico dos fetos (SILVA et al., 2017).

No presente estudo foi verificado que não houve diferenças histomorfométricas significativas nas áreas das zonas de proliferação e das zonas hipertróficas do disco epifisário durante o processo da ossificação endocondral entre o grupo controle e o grupo tratado. Porém, na área celular dos condrócitos presente nas zonas analisadas apresentaram médias menores comparado ao grupo controle. Segundo Pramyothin et al. (2004), o ácido úsnico é capaz de afetar a integridade da membrana plasmática celular e causar destruição da função mitocondrial, pela perda do controle da respiração celular e na síntese de ATP podendo causar alterações no desenvolvimento, morfologia e até mesmo a morte celular. Embora, estes resultados apresentem toxicidade do ácido úsnico encapsulado a nível celular, indica uma redução da sua toxicidade por encapsulação em microesferas de PLGA, quando comparado com a sua forma livre.

Enquanto, ao menor número de condrócitos nas zonas de proliferação do grupo tratado pode estar relacionado a interação das proteínas da matriz extracelular com os receptores da superfície celular que interagem diretamente, iniciando vias de transdução de sinal e induzindo diferentes processos, como a proliferação celular. E tendo em vista, que o ácido úsnico age na integridade da membrana plasmática celular, o mesmo pode afetar as interações das proteínas com os receptores da superfície celular (PRAMYOTHIN et al, 2004; IRVING-RODGERS et al., 2010; DE SOUZA et al., 2011).

Nas análises da quantidade de colágeno do tipo I presente no tecido ósseo dos membros dos fetos tratados, os membros anteriores não apresentaram médias significativas em relação ao grupo controle. Em contrapartida, os membros posteriores apresentaram uma diminuição significativa em relação à média comparada ao grupo controle, tendo relação com o desenvolvimento embrionário dos membros dos neonatos, visto que os membros anteriores se desenvolvem primeiro do que os posteriores. Uma vez que, a administração do composto no presente estudo foi realizada a partir do 6º dia de gestação. E conforme a literatura, neste período de desenvolvimento embrionário dos ratos, a osteogênese dos membros anteriores já se

encontram preestabelecida. Desta forma, a administração de fármacos durante o período de desenvolvimento dos membros pode desencadear diferentes respostas em ambos os membros (CARMO; PETERS; GUERRA, 2004; TIBONI et al., 2006).

Conforme Manela-Azulay et al. (2003), a síntese de colágeno pode ser influenciada pela exposição a substâncias tóxicas, que podem inibir a ação de algumas enzimas, como a prolina hidroxilase e a lisina hidroxilase responsáveis pelo processo de hidroxilação durante a síntese de colágeno. Desta maneira, o efeito do ácido úsnico pode estar relacionado à inibição da ação destas enzimas, e conseqüentemente, resultando em uma menor quantidade de colágeno. Sendo necessários realizações de estudos mais detalhados, como moleculares e bioquímicos para afirmar com maior exatidão esta hipótese (GUSTAFSSON et al., 2003; SILVA & PENNA 2012).

Apesar do ácido úsnico na sua forma encapsulada na dose de 25 mg/kg/dia por via oral ter apresentado toxicidade no desenvolvimento da ossificação endocondral dos neonatos, podemos dizer que o presente estudo apresentou um nível de toxicidade moderada quando comparada com a administração do ácido úsnico na sua forma livre na dose de 25 mg/kg/dia por via oral (Silva et al., 2017). Deste modo, indica que a encapsulação é capaz de reduzir os efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento ósseo causado por essa substância.

Machida et al. (2000), avaliaram o CPT-11 encapsulado em microesferas de PLGA sobre células cancerígenas em ratos. Os resultados demonstraram que a encapsulação do fármaco não só potencializou a sua atividade antitumoral, como também diminuiu a sua toxicidade. Desde modo, este estudo confirma a eficácia das microesferas de PLGA em diminuir efeitos tóxicos.

Em anos seguintes, foi analisada a atividade antimetastática e a toxicidade sistêmica da camptotecina encapsulada em microesferas, e na sua forma livre em camundongos. Os dados revelaram que o fármaco encapsulado apresentou atividade antimetastática semelhante ao da sua forma livre, mas a sua toxicidade sistêmica, tais como perda de peso, sobrevivência dos animais e contagem de neutrófilos foi bem menor em relação ao composto na sua forma livre. Este estudo, confirma a diminuição de efeitos tóxicos de drogas através de alternativas inovadoras, como a encapsulação (DORA et al., 2006).

Pesquisas sobre a toxicidade hepática de microesferas de PLGA contendo ácido úsnico na dose de 25 mg/kg/dia durante o período gestacional de ratas Wistar relatam toxicidade do fármaco encapsulado, porém, em proporções bem menores do que as já encontradas para o ácido úsnico em sua forma livre (MARINHO et al., 2017). Diante desses achados, conclui-se

que a toxicidade do composto pode ser minimizada por meio da sua encapsulação por microesferas de PLGA.

Estes estudos citados no presente trabalho, confirmam que os sistemas de liberação controlada reduzem os efeitos colaterais e assegura uma maior biodisponibilidade aos fármacos. E quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos, os sistemas de liberação controlada oferecem a grande vantagem de manter a concentração do fármaco constante na faixa terapêutica por um período prolongado aumentando a eficácia terapêutica e diminuindo significativamente a toxicidade (HENRIQUE et al., 2006).

Portanto, o modelo experimental utilizado no presente trabalho demonstrou que a administração do ácido úsnico na sua forma encapsulada em microesferas de PLGA na dose de 25 mg/kg/dia por via oral apresenta uma toxicidade moderada sobre o desenvolvimento ósseo. Demonstrando que a toxicidade do composto pode ser minimizada por meio da sua encapsulação em microesferas de PLGA.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e o modelo experimental utilizado, é possível concluir que a administração do ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA reduz moderadamente a toxicidade do composto. Desta forma, esse estudo sugere que a liberação controlada do ácido úsnico de *Cladonia substellata* encapsulado em microesferas de PLGA minimiza os efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento ósseo da prole de ratas Wistar.

REFERÊNCIAS

- ALBANO, M. B. **Análise histológica dos efeitos do corticoesteróide na cartilagem hialina do joelho de coelhos utilizando as colorações hematoxilina-eosina e safranina.** Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, 2005.
- ARANA, V. **Biologia celular e tecidual para odontologia: moléculas, células e tecidos.** Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2013.
- ARRUDA, M. F. **Resposta imuno-bioquímica e avaliação histológica da cartilagem articular de ratos artrose induzidos, frente ao tratamento com iontoforese isolada e de ácido L-ascórbico.** Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas a Farmácia, Universidade Estadual Paulista, 2010.
- ASZÓDI, A.; BATEMAN, J. F.; GUSTAFSSON, E.; BOOT-HANDFORD, R.; FÄSSLER, R. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix. What can we learn from knockout mice? **Cell structure and function**, v. 25, n. 2, p. 73-84, 2000.
- ATAYDE, S. A. **Estudo da histoarquitetura do colágeno da cartilagem, ligamentos e sinóvia em modelo experimental de diabetes mellitus.** Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de São Paulo, 2011.
- ATTUR, M. G., DAVE, M., AKAMATSU, M., KATOH, M., & AMIN, A. R. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, n. 1, p. 1-4, 2002.
- BARROCAS, P. M. C.; SANTOS, D. F. G.; FRREIRA, C. D.; COELHO, P. M. B. S.; OLIVEIRA, R. C. S.; VEIGA, F. J. B. Sistemas farmacêuticas gastrorretentivos flutuantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 325-334, 2007.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. **Avaliação da toxicidade.** In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de toxicologia. 3ª ed., São Paulo: Atheneu Editora, 2008.
- BASU, A., & WEZEMAN, F. H. Developmental toxicity of valproic acid during embryonic chick vertebral chondrogenesis. **Spine**, v. 25, n. 17, p. 2158-2164, 2000.
- BATTS, J. E., CALDER, L. J., & BATTS, B. D. Utilizing stable isotope abundances of lichens to monitor environmental change. **Chemical Geology**, v. 204, n. 3-4, p. 345-368, 2004.
- BEHERA, B. C.; MAHADIK, N.; MOREY, M. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usneacomplanata* under submerged fermentation. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, p. 968–979, 2012.
- BENATTI, M. N.; MARCELLI, M. P. Gêneros de fungos liquenizados dos manguezais do Sul-Sudeste do Brasil, com enfoque no manguezal do Rio Itanhaém, Estado de São Paulo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 4, p. 863-878. 2007.

BERKLAND, C.; KIPPER, M. J.; NARASIMHAN, B.; KYEKYOON K. K.; PACK, D. W. Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 94, n. 1, p. 129-141, 2004.

BÍBLIA, A. T. Coríntios. In BÍBLIA. Português. **Sagrada Bíblia Católica**: Antigo e Novo Testamentos. Tradução de José Simão. São Paulo: Sociedade Bíblica de Aparecida, p. 202, 2008.

BOMFIM, R. R.; ARAUJO, A. A. S.; CUADROS-ORELLANA, S.; MELO, M. G. D.; QUINTANS, L. J.; CAVALCANTI, S. C. H. Larvicidal activity of *Cladonia substellata* extract and usnic acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 4, p. 580-584, 2009.

BOUSTIE, J.; TOMASI, S.; GRUBE, M. Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as a untapped source. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 3, p. 287-307. 2010.

BRISDELLI, F.; PERILLI, M.; SELITRI, D.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J. A.; NICOLETTI, M.; CELENZA, G. Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites: An In Vitro Study. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 3, p. 431-437, 2013.

BRUNO, M.; TRUCCHI, B.; BURLANDO, B.; RANZATO, E.; MARTINOTTI, S.; AKKOL, E. K.; VEROTTA, L. (p)-Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1834-1843, 2013.

BUDEL, B.; SCHEIDEGGER, C. **Thallus morphology and anatomy**. In: NASH, T. III (Ed.) **Lichen Biology**. 2. ed. Cambridge, Cambridge University Press, p. 40-68, 2008.

BURLANDO, B.; RANZATO, E.; VOLANTE, A.; APPENDINO, G.; POLLASTRO, F.; VEROTTA, L. Introduction. **Planta Medicinal**, v. 75, p. 607-613, 2009.

BUSTINZA, F. Contribución al estudio de las propiedades antibacterianas de la bacitracina. **Anales Del Jardín Botánico de Madrid**, p. 583-590, 1950.

CAJUEIRO, E. S.; RIBEIRO, B. R. L.; PARTATA, A. K. isotretinoína e suas propriedades farmacológicas. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2014.

CAMPANELLA, L.; DELFINI, M.; ERCOLE, A.; IACOANGELI, E.; RISULEO, G. Molecular characterization and action of usnic acid a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription. **Biochimie**, v. 84, n. 4, p. 329-334, 2002.

CAMPOS, G.; LÓPEZ, V. Physiological and biochemical investigations on the phytotoxicity of usnic acid. **Oyton**, v. 29, p. 63-72. 1972.

CAPRIOTTI, A. The effect of Usno on yeast isolated from the excretion of tuberculosis patients. **Antibiotics & Chemotherapy**, v. 11, p. 409-410. 1961.

CARDARELLI, M.; SERINO, G.; CAMPANELLA, L.; ERCOLE, P.; DE CICCO NARDONE, F.; ALESIANI, O.; ROSSIELO, F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. **CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, p. 667–672. 1997.

CARMO, J. C.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. O. Cronologia do desenvolvimento embrionário e fetal de ratos, conforme a datação do início da prenhez. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 23, p. 5-16, 2004.

CARRAZONI, E. D. Estudo químico de líquens VIII: isolamento dos constituintes da *Cladonia sprucey*. **Revista Química e Tecnologia**, v. 2, n. 1, p. 32-34, 2003.

CHAMBERS, M. G.; KUFFNER, T.; COWAN, S. K.; CHEAH, K. S. E.; & MASON, R. Expression of collagen and aggrecan genes in normal and osteoarthritic murine knee joints. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, n. 1, p. 51-61, 2002.

CHANNA, H. M.; ASHFAQ, M.; BANGASH, R.; ABBASI, A.; QURESHI, M. A. Preventive role of zinc chloride against toxicity of ciprofloxacin on the growing cartilage of Wistar albino rat litter. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, v. 20, n. 4, p. 77-81, 2008.

CHIEN, Y. W.; LIN, S. Optimisation of treatment by applying programmable rate-controlled drug delivery technology. **Clinical pharmacokinetics**, v.41, n.15, p. 1267-1300, 2002.

CHOI, M. S.; YOO, M. S.; SON, D. J.; JUNG, H. Y.; LEE, S. H.; JUNG, J. K.; HONG, J. T. Increase of collagen synthesis by obovatol through stimulation of the TGF- β signaling and inhibition of matrix metalloproteinase in UVB-irradiated human fibroblast. **Journal of dermatological Science**, v. 46, n. 2, p. 127-137, 2007.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L.; SAVA, G. A. review on usnic acid, na interesting natural compound, **Naturwissenschaften**. v. 89, n. 4, p.137-146, 2002.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e caracterização de sistemas de liberação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2010.

DA SILVA SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; WANDERLEY, M. S. O.; PONTES-FILHO, N. T.; DA SILVA, J. F.; DE CASTRO, C. M. M. B.; Santos-Magalhaes, N. S. Nanoencapsulation of usnic acid: an attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 2, p. 154-160, 2006.

DE SOUZA, R. S.; DA SILVA, P. M. A. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 36, n. 1, 2011.

DOLCI, G. S. **Efeitos da atorvastatina sobre a ossificação endocondral de fêmures, remodelação óssea e movimentação dentária induzida, estudo em ratos**. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Odontologia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

DORA, C. L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G.; DE FARIA, T. J.; FERNANDES, D.; DA COSTA, R.; LEMOS-SENNA, E. Evaluation of antimetastatic activity and systemic toxicity of camptothecin-loaded microspheres in mice injected with B16-F10 melanoma cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 22-31, 2006.

DUEWELHENKE, N.; KRUT, O.; EYSEL, P. Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 54-63, 2006.

ELO, H.; MATIKAINEN, J.; PELTTARI, E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Naturwissenschaften**, v.94, n. 6, p. 465-468, 2007.

EYRE, D. R.; WU, J. J. Collagen structure and cartilage matrix integrity. **The Journal of rheumatology. Supplement**, v. 43, p. 82-85, 1995.

FAVREAU, J. T.; RYU, M. L.; BRAUNSTEIN, G.; ORSHANSKY, G.; PARK, S. S.; COODY, G. L.; FONG, T. L. Severe hepatotoxicity associated with the dietary supplement lipokinetix, **Annals of Internal Medicine**, v. 136, n. 8, p. 590-595, 2002.

FIALHO, S. L.; REGO, M. G. B.; CARDILLO, J. A.; SIQUEIRA, R.; JORGE, R.; CUNHA JÚNIOR, A. S. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 6, p. 891-6, 2003.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 361-375, 2008.

FRANCO, C. R.; TRINDADE, E. S.; ROCHA, H. A.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; PALUDO, K. S.; CHAMMAS, R.; DIETRICH, C. P. Glycosaminoglycan chains from $\alpha 5 \beta 1$ integrin are involved in fibronectin-dependent cell migration. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 87, n. 4, p. 677-686, 2009.

FRANKOS, V. N. T. P. **Nomination for usnic acid and *Usnea barbata* herb**. Food and Drug Administration, Division of Dietary Supplement Programs. <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/ChemiBackground/ExSumpdf/UsnicAcid.Pdf>. 2005.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International journal of pharmaceutics**, v. 282, n. 1, p. 1-18, 2004.

GOISSIS, A. P. A. **Análise estrutural do colágeno do tipo I-correlação estrutura: atividade biológica**. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Interunidades em Bioengenharia, Faculdade de Medicina de Ribeirão de São Paulo, 2007.

GREGÓRIO, E. A. **Matriz Extracelular**. 2011. [aula online] Disponível em: http://www.ibb.unesp.br/departamentos/Morfologia/material_didatico/Profa_Elisa/matriz_ext_racelular_med.PDF. Acesso em: 02 out. 2018.

GREGORY, K. E.; OXFORD, J. T.; CHEN, Y.; GAMBEE, J. E.; GYGI, S. P.; AEBERSOLD, R.; MORRIS, N. P. Structural organization of distinct domains within the

non-collagenous N-terminal region of collagen type XI. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 15, p. 11498-11506, 2000.

GRUMEZESCU, V.; HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M.; SOCOL, G.; FICAI, A.; VASILE, B. S.; MOGOSANU, G. D. Usnic acid-loaded biocompatible magnetic PLGA-PVA microsphere thin films fabricated by MAPLE with increased resistance to staphylococcal colonization. **Biofabrication**, v. 6, n. 3, p. 035002, 2014.

GUSTAFSSON, E.; ASZODI, A.; ORTEGA, N.; HUNZIKER, E. B.; DENKER, H. W.; WERB, Z.; FÄSSLER, R. Role of collagen type II and perlecan in skeletal development. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 995, n. 1, p. 140-150, 2003.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1092, p. 385-396, 2006.

HALAMA, P.; VAN HALUWIN, C. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. **BioControl**, v. 49, n. 1, p. 95-107, 2004.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 319-327, 2002.

HAY, E. D. (Ed.). **Cell biology of extracellular matrix**. Springer Science & Business Media, 2013.

HECKER, M.; VOLP, A. Tolerability of icelandic moss lozenges in upper respiratory tract diseases-multicentric drug monitoring study with 2, 143 children. **Forschende Komplementarmedizin und Klassische Naturheilkund**, v. 11, n. 2, p. 76-82, 2004.

HENRIQUE, J. S.; FALCARE, R. S.; LOPES, P. S. Sistemas de liberação controlada. **Pharmacia Brasileira**, v. 56, p. 22, 2006.

HONDA, N. K.; PAVAN, F. R.; COELHO, R. G.; ANDRADE LEITE, S. R.; MICHELETTI, A. C. Antimicrobial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, v. 17, p. 328-332, 2010.

HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1216-1219, 2009.

INADA, M.; WANG, Y.; BYRNE, M. H.; RAHMAN, M. U.; MIYAURA, C.; LÓPEZ-OTÍN, C.; KRANE, S. M. Critical roles for collagenase-3 (Mmp) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17192-17197, 2004.

INGOLFSDOTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**, v. 61, n. 7, p. 729-736, 2002.

IRVING-RODGERS, H. F.; HUMMITZSCH, K.; MURDIYARSO, L. S.; BONNER, W. M.; SADO, Y.; NINOMIYA, Y. Dynamics of extracellular matrix in ovarian follicles and corpora lutea of mice. **Cell Tissue Research**, v. 339, n. p. 613-24, 2010.

IVANOVA, D.; INVANOV, D. Ethnobotanical use of lichens: lichens for food review. **Scripta Scientifica Medica**, v. 41, p. 11-16, 2009.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v.21, n. 23, p.2475-2490, 2000.

JUDAS, F.; PALMA, P.; FALACHO, R. I.; FIGUEIREDO, H. **Estrutura e dinâmica do tecido ósseo**, 2012.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KÄFFER, M. I.; CÁCERES, M. E. S.; VARGAS, V. M. F.; & MARTINS, S. D. A. Novas ocorrências de líquens corticícolos crostosos para a região sul do Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, Minas Gerais, v. 24, n. 4, p. 948-951, 2010.

KEDE, M. P.V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética**. 2ª ed. rev. e ampl. São Paulo: Atheneu, 2009.

KOHLHARDT-FLOEHR, C.; BOEHM, F.; TROPPENS, S.; LADEMANN, J.; TRUSCOTT, T. G. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.101, n. 1, p. 97–102, 2010.

KOTWAL, V. B.; SAIFFEE, M.; INAMDAR, N.; BHISE, K. Biodegradable polymers: Which, when and why? **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 5, p. 616, 2007.

KRONENBERG, H. M. Developmental regulation of the growth plate. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 332-336, 2003.

KUPCHAN, M. S.; KOPPERMAN, H. L. L-Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 31, n. 6, p. 625-625, 1975.

LEMONICA, I. P.; OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. **Editora Atheneu**, v. 3, p. 59-71, 2008.

LIU, W. H.; SONG, J. L.; LIU, K.; CHU, D. F.; LI, Y. X. Preparation and in vitro and in vivo release studies of Huperzine A loaded microspheres for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Controlled Release**, v. 107, n. 3, p. 417-427, 2005.

LONG, F.; ORNITZ, D. M. Development of the endochondral skeleton. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 1, p. 8334, 2013.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; ROCA, M. F. L.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. S. ROLIM-NETO, P. J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e

Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, vol. 26, n. 5, p. 784-793. 2007.

MACHIDA, Y.; ONISHI, H.; KURITA, A.; HATA, H.; MORIKAWA, A.; MACHIDA, Y. Pharmacokinetics of prolonged-release CPT-11-loaded microspheres in rats. **Journal of controlled release**, v. 66, n. 2-3, p. 159-175, 2000.

MACKIE, E. J.; TATARCZUCH, L.; MIRAMS, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. **Journal of Endocrinology**, v. 211, n. 2, p. 109-121, 2011.

MARINHO, K. S.; ANTONIO, E. A.; SILVA, C. V.; SILVA, K. T.; TEIXEIRA, V. W.; AGUIAR JUNIOR, F. C. D.; SANTOS, N. P. Hepatic toxicity caused by PLGA-microspheres containing usnic acid from the lichen *C. ladonia substellata* (AHTI) during pregnancy in Wistar rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 2, p. 1073-1084, 2017.

MARTINELLI, A.; BAKRY, A.; D'ILARIO, L.; FRANCOLINI, I.; PIOZZI, A.; TARESCO, V. Release behavior and antibiofilm activity of usnic acid-loaded carboxylated poly (l-lactide) microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 2, p. 415-423, 2014.

MARTINS, M. C. B. **Aplicações Biotecnológicas de Compostos Obtidos dos Liquens**. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

MITCHELL, J. C.; SHIBATA, S. Immunologic activity of some substances derived from lichenized fungi. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 52, n. 6, p. 517- 520. 1969.

MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 65, p. 157 – 173, 2010.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 1-11, 1991.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. Elsevier Brasil, 2008.

MORRIS, N. P.; BÄCHINGER, H. P. Type XI collagen is a heterotrimer with the composition (1 alpha, 2 alpha, 3 alpha) retaining non-triple-helical domains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 23, p. 11345-11350, 1987.

MULLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 56, n. 1-2, p. 9-16, 2001.

NASH, T. H. Lichen Biology. Cambridge: **Cambridge University Press**, São Paulo, p. 303, 2008.

NITHYANAND, P.; SHAFREEN, R. M. B.; MUTHAMIL, S.; PANDIAN, S. K. Usnic acid inhibits biofilm formation and virulent morphological traits of *Candida albicans*. **Microbiological research**, v. 179, n. 1, p. 20-28, 2015.

NUNES, P. S.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L.; CAVALCANTE, D. R.; DANTAS, M. D.; CARDOSO, J. C.; BEZERRA, M. S.; ARAÚJO, A. A. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

ODABASOGLU, F.; ÇAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin induced gastric ulcer in rats. **Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 59-65, 2006.

OKSANEN, I. Ecological and biotechnological aspects of lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 723-734. 2006.

OLIVEIRA, M. Z.; ALBANO, M. B.; NAMBA, M. M.; DA CUNHA, L. A. M.; DE LIMA GONÇALVES, R. R.; TRINDADE, E. S.; VIDIGAL, L. Efeito dos ácidos hialurônicos como condroprotetores em modelo experimental de osteoartrose. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 49, n.1, p. 62-68, 2014.

OLSEN, B. R.; REGINATO, A. M.; WANG, W. "Bone development" Annual **review of cell and developmental biology**, v.16, n. 1, p. 191-220, 2000.

OTÁLORA, M. A. G.; MARTINEZ, I.; O'BRIEN, H.; MOLINA, M. C.; ARAGÓN, G.; LUTZONI, F. Multiple origins of high reciprocal symbiotic specificity at a intercontinental spatial scale among gelatinous lichens (Collembataceae, Lecanoromycetes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, p. 1089–1095. 2010.

PARCCELI, F. S. S. S.; MEDEIROS, H. L. B.; DE OLIVEIRA, T. K. B.; ASSIS, T. O.; VILAR, M. S. A. Análise histológica do impacto da isotretinoína na ossificação endocondral em ratos Wistar. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, p. 75-80, 2015.

PETITTI, M.; VANNI, M.; BARRESI, A.A. Controlled release of drug encapsulated as a solid core: Theoretical model and sensitivity analysis. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 86, n. 11, p. 1294-1300, 2008.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.

PIOVANO, M.; GARBARINO, J. A.; GIANNINI, F. A.; CORRECHE, E. R.; FERESIN, G.; TAPIA, A.; ENRIZ, R. D. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 47, n. 3, p. 235-240, 2002.

PIZAURO JÚNIOR, J. M.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p. 169-186, 2002.

PRAMYOTHIN, P.; JANTHASOOT, W.; PONGNIMITPRASERT, N.; PHRUKUDOM, S.; RUANGRUNGSI, N. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. **Journal Ethnopharmacol**, v. 90, n. 2, p. 381-387, 2004.

PRAMYOTHIN, P.; JANTHASOOT, W.; PONGNIMITPRASERT, N.; PHRUKUDOMC, S.; RUANGRUNGSI, N. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria, **Journal Ethnopharmacol.** v.90 p. 381-387, 2004.

RIBEIRO-COSTA, R. M.; ALVES, A. J.; SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; GONÇALVES, E. C.; SILVA, N. H.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, p. 371-384, 2004.

RIBEIRO-COSTA, R. M.; CUNHA, M. R.; GONGORA-RUBIO, M. R.; MICHALUARTJÚNIOR, P.; RÉ, M. I. Preparation of protein-loaded-PLGA microspheres by na emulsion/solvent evaporation process employing LTCC micromixers. **Powder Technology**. v.190, n. 1, p.107-111, 2009.

RODRIGUES, V. **Análises dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos**. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, 2009.

SAHIB, K.; KULARATNE, N. S.; KUMAR, S.; KARUNARATNE, V. Effect of (+)-usnic acid on the shot-hole borer (*Xyleborus fornicatus* Eichh.) of tea. **National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 36, p. 335-336, 2008.

SANCHEZ, W.; MAPLE, J. T.; BURGART, L. J.; KAMATH, P. S. Severe hepatotoxicity associated with use of a dietary supplement containig usnic acid, **Mayo Clinic Proceedings**, v. 81, n. 4, p. 541-544, 2006.

SCIRPA, P.; SCAMBIA, G.; MASCIULLO, V.; BATTAGLIA, F.; FOTI, E.; LOPEZ, R.; MANCUSO, S. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by Human Papillomavirus. **Minerva ginecologica**, v. 51, n. 6, p. 255-260, 1999.

SEGATORE, B.; BELLIO, P.; SETACCI, D.; BRISDELLI, F.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J. A.; CELENZA, G. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3, p. 341-347, 2012.

SERRANO, E.; PÉREZ, J. M.; CHRISTIANSEN, P.; GÁLLEGO, L. Sex-Difference in The Ossification Rate of The Appendicular Skeleton in *Capra pyrenaica* Schinz, 1838, and Its Utility in The Sex Identification of Long Bones. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 35, n. 2, p. 69-75, 2006.

SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; MALMONGE, S. M.; SOUTO, E. B. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. **Polímeros**, v. 21, n. 5, p. 361- 368, 2011.

SHTRO, A. A.; ZARUBAEV, V. V.; LUZINA, O. A.; SOKOLOV, D. N.; KISELEV, O. I.; SALAKHUTDINOV, N. F. Novel derivatives of usnic acid effectively inhibiting reproduction of influenza A virus. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 24, p. 6826-6836, 2014.

SILVA, C. R.; MARINHO, K. S. N.; SILVA, T. D. S.; FERREIRA, D. K. S.; AGUIAR, G. M.; MARTINS, M. C. B.; SILVA, N. H. Teratogenic effect of usnic acid from *Cladonia substellata* Vainio during organogenesis. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, 2003.

SILVA, K. T. **Análise histomorfométrica da deposição do colágeno dos membros da prole de ratas wistar submetidas ao ácido úsnico durante a prenhes**. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 530-539, 2012.

SIMONI, M. A.; GEGOUT-POTTIE, P.; MINN, A.; GILLET, P.; NETTER, P.; TERLAIN, B. Pefloxacin-induced Achilles tendon toxicity in rodents: biochemical changes in proteoglycan synthesis and oxidative damage to collagen. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 867-872, 2000.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; LIRA, M. C. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 1-8, 2008.

SOARES, A. Q.; OLIVEIRA, L. F.; RABELO, D.; SOUZA, A. R. Polímeros Biodegradáveis: Novas Perspectivas Para As Ciências Farmacêuticas. **Revista Eletrônica De Farmácia Suplemento**, v. 2, n. 2, p. 202-205, 2005.

SOARES, J. F.; ILHA, R.; ZAZYCKI, M. A.; BERNARDES, R. C. C.; MORTARI, S. R.; DE VASCONCELLOS, N. J. S. Absorção de chumbo antrópico por populações de líquens do gênero *Usnea* em área industrial. **Revista Monografias Ambientais**, Santa Maria-RS, v. 13, n. 5, p. 3831-3836, 2014.

SOKOLOV, D. N.; ZARUBAEV, V. V.; SHTRO, A. A.; POLOVINKA, M. P.; LUZINA, O. A.; KOMAROVA, N. I.; SALAKHUTDINOV, N. F.; KISELEV, O. I. Anti-viral activity of (-)-and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A (H1N1) 2009. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 23, p. 7060-7064, 2012.

SOLIS-HERRUZO, J. A., BRENNER, D. A., & CHOJKIER, M. Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 12, p. 5841-5845, 2005.

SU, Z. Q.; MO, Z. Z.; LIAO, J. B.; FENG, X. X.; LIANG, Y. Z.; ZHANG, X.; LAI, X. P. Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. **International immunopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 371-378, 2014.

SUWALSKY, M.; JEMIOLA-RZEMINSKA, M.; ASTUDILLO, C.; GALLARDO, M. J.; STAFORELLI, J. P.; VILLENA, F.; STRZALKA, K. (2015). An in vitro study on the antioxidant capacity of usnic acid on human erythrocytes and molecular models of its

membrane. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1848, n. 11, p. 2829-2838, 2015.

THEOCHARIS, A. D.; SKANDALIS, S. S.; TZANAKAKIS, G. N.; KARAMANOS, N. K. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. **The FEBS journal**, v. 277, n. 19, p. 3904-3923, 2010.

TIBONI, G. M.; MAROTTA, F. D. E. L.; CORSO, A.; GIAMPIETRO, F. Definição de períodos críticos para fissura de palato induzida por itraconazol, defeitos nos membros e malformações esqueléticas axiais no camundongo. **Toxicology Letters**, v. 167, n. 1, p. 8–18, 2006.

TIWARI, P.; RAI, H.; UPRETI, D. K. U.; TRIVEDI, S.; SHUKLA, P. Antifungal activity of a common Himalayan foliose lichen *Parmotrema tinctorum* (Despr. Ex Nyl.) Hale. **Natural Science**, v. 9, p. 167-171. 2011.

TRUJILLO, H. A. G. **Formação e desenvolvimento dos membros de embriões e fetos bovinos**. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2007.

VANWANSEELE, B.; LUCCHINETTI, E.; STÜSSI, E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 10, n. 5, p. 408-419, 2002.

VARANI, J.; DAME, M. K.; RITTIE, L.; FLIGIEL, S. E.; KANG, S.; FISHER, G. J.; VOORHEES, J. J. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. **The American journal of pathology**, v. 168, n. 6, p. 1861-1868, 2006.

VELOSA, A. P. P.; TEODORO, W. R.; & YOSHINARI, N. H. Collagen in osteoarthrotic cartilage. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 160-166, 2003.

VERA, J. P.; HORNECK, G.; RETTBERG, P.; OTT, S. The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space. I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. **International Journal of Astrobiology**, v. 1, n. 4, p. 285-293, 2002.

VERA, J. P.; HORNECK, G.; RETTBERG, P.; OTT, S. The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space. II. Geminon of UV radiation capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. **Advances in Space Research**, v. 33, n. 8, p.1236-1243, 2004.

VICENTE, C.; GUERRA, H.; VALLE, M. T. Formas moleculares de glutamatodeshidrogenasa, NADPH dependiente, producidas por acción Del L-usnato sódico. **Revista Espanhola Fiologia**, v. 29, p. 301-306. 1973.

VICENTE. C.; AZPIROZ, A.; ESTÉVEZ, M. P.; GONZÁLEZ, M. L. Quaternary structure changes and kinetics of uréase inactivation by L-usnic acid in relation to the nutrient transfer between lichen symbionts. **Plant, Cell & Environment**, v. 1, p. 29-33. 1978.

VIJAYAKUMAR, C. S.; VISWANATHAN, S.; REDDY, M. K.; PARVATHAVARTHINI, S.; KUNDU, A. B.; SUKUMAR, E. Anti-inflammatory activity of (+)- usnic acid. **Fitoterapia**, v. 71, n. 5, p. 564–566, 2000.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, 2010.

VIRTANEN, O. E.; KILPI, O. E. On the *in vivo* fungistatic activity of an usnic acidpreparation with the trade name Usno. **Suomen Kemistilehti**, v. 30, p. 8-9, 1957.

WEBSTER, W. S.; FREEMAN, J. A. Is this drug safe in pregnancy? **Reproductivetoxicology**, v.15, n. 6, p. 619-629, 2001.

WILL-WOLF, S.; HAWKSWORTH, D. L.; MCCUNE, B. Lichenized fungi. In: Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. **Elsevier Academic Press**, p. 173-195, 2004.